

Control biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (G. Winter)

Honey, con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero

(*Prunus persica* [L.] Batsch)

Mónica Jovanna Patiño Pacheco

Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD

Escuela de Ciencia Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAMPA

Especialización en Biotecnología Agraria

Tunja

2020

**Control biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (G. Winter)
Honey, con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero
(*Prunus persica* [L.] Batsch)**

Mónica Jovanna Patiño Pacheco

**Trabajo De Investigación Presentado para optar el título de
Especialista en Biotecnología Agraria**

Director

Jorge Armando Fonseca

Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD

Escuela de Ciencia Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAMPA

Especialización en Biotecnología Agraria

Tunja

2020

Página de Aceptación

Jorge Armando Fonseca

Director Trabajo de Grado

Jurado

Jurado

CEAD Tunja, 2020

Dedicatoria

A DIOS TODO PODEROSO por ayudarme y levantarme en momentos difíciles y permitirme culminar un gran sueño que empezó hace unos años. “Si el afligido invoca al Señor, él lo escucha y lo salva de todas sus angustias (Salmo 34, 5).

A mi familia, a mi padre quien me ha motivado ser siempre una mejor persona, mi madre que es mi modelo a seguir y quien ha sido siempre mi gran amiga, a mis hermanas, mis sobrinos y mi cuñado. Gracias por motivarme por creer en mí a todos ellos a quienes amo les dedicó este trabajo.

Agradecimiento

Quiero agradecer primeramente a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), por darme la oportunidad de formarme como Especialista. Al docente Jorge Armando Fonseca por su amistad, todo su conocimiento y por realizar la dirección de este trabajo de investigación. A los profesores de la Especialización en Biotecnología Agraria, en especial a Camilo Torres, Sandra Montenegro y René Montero, por compartir todo su conocimiento y su amistad. “A todos ellos mi gran admiración”.

A Carolina, Milena, Guillermo y Ángela, Jorge Barón, por todos los bellos momentos compartidos y su valiosa amistad que es un verdadero tesoro para mí. A los profesores de la UPTC Jorge Blanco y Jorge Velandía, por su amistad y compartir conmigo todo su conocimiento en fitopatología. A la profesora Adriana González de la UNAL sede Bogotá, por compartir todo su conocimiento y su pasión por fitopatología en especial por la Bacteriología.

Gracias a todos.....

Resumen

La pudrición parda causada por *Monilinia fructicola*, es la enfermedad fúngica más importante en el cultivo de duraznero a nivel mundial, reduce la calidad y rentabilidad de las cosechas. *Bacillus subtilis* es un biopesticida que utiliza diferentes mecanismos en el control de fitopatógenos, sin ejercer un impacto negativo en el entorno. Por ende, el objetivo de este trabajo fue, evaluar el efecto antifúngico de dos cepas de *Bacillus subtilis* (CB10 y CB11), y un fungicida (Dicloram) contra la pudrición parda causada por (*Monilinia fructicola*) en duraznero. En pruebas in vitro se evaluó la tasa y halo de inhibición del patógeno. En frutos se evaluó la tasa de inhibición y el porcentaje de severidad de la enfermedad después de la inoculación con el patógeno. Según, los resultados en pruebas in vitro se demostraron que la cepa CB10 de *B. subtilis* registró una tasa de inhibición del 88, 5% y un halo de inhibición de 14 mm controlando el crecimiento y esporulación del patógeno. En frutos inoculados con la misma cepa, se registró una tasa de inhibición del 95% y una severidad menor al 10%. Los tratamientos con el fungicida y la cepa CB11 de *B. subtilis*, la tasa de inhición fue del 70% y la severidad fue del 30 – 35% en frutos inoculados. Como conclusión de este trabajo se puede afirmar que la cepa CB10 de *B. subtilis* puede utilizarse en el control biológico de *M. fructicola*, garantizando un manejo más eficiente y ecológico de este patógeno.

Palabras clave: Control biológico, pudrición parda, severidad, tasa de inhibición.

Abstract

Brown rot caused by *Monilinia fructicola*, is the most important fungal disease in peach cultivation worldwide, reduces the quality and profitability of crops. *Bacillus subtilis* is a biopesticide that uses different mechanisms to control plant pathogens, without having a negative impact on the environment. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antifungal effect of two strains of *Bacillus subtilis* (CB10 and CB11), and a fungicide (Dicloram) against brown rot caused by (*Monilinia fructicola*) in peach tree. In vitro tests evaluated the rate and halo of inhibition of the pathogen. In fruits, the inhibition rate and the percentage of severity of the disease were evaluated after inoculation with the pathogen. According to, the results in in vitro tests showed that the *B. subtilis* strain CB10 registered an inhibition rate of 88, 5% and a halo of inhibition of 14 mm controlling the growth and sporulation of the pathogen. In fruits inoculated with the same strain, an inhibition rate of 95% and a severity of less than 10% were recorded. Treatments with the fungicide and the CB11 strain of *B. subtilis*, the inhibition rate was 70% and the severity was 30 - 35% in inoculated fruits. As a conclusion of this work, it can be stated that the CB10 strain of *B. subtilis* can be used in the biological control of *M. fructicola*, guaranteeing a more efficient and ecological management of this pathogen.

Keywords: Biocontrol, brown rot, inhibition rate, severity.

INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO 1. Marco teórico. Generalidades del cultivo de duraznero (<i>Prunus persica</i> [L.] Batsch), la pudrición parda (<i>Monilinia fructicola</i> Honey ex Whetzel) y <i>Bacillus subtilis</i>.....	17
1.1 Duraznero (<i>Prunus persica</i> [L.] Batsch)	17
1.1.2 Producción	18
1.1.3 Características de los suelos y requerimientos nutricionales	19
1.1.4 Variedades	19
1.1.5 Aspectos fenológicos del cultivo.....	21
1.1.6 Enfermedades	22
1.2 <i>Monilinia</i>	23
1.2.1 Clasificación.....	24
1.2.2 Morfología.....	25
1.2.3 Desarrollo de la enfermedad.....	26
1.2.4 Síntomas.....	27
1.2.5 Control químico.....	28
1.2.6. Controles alternativos	30
1.2.7 Control biológico	31
1.3 <i>Bacillus subtilis</i>	31
1.3.1 Clasificación.....	32
1.3.2 Características	32
1.3.3 Mecanismos de biocontrol	32
1.3.4 Productos registrados en Colombia para <i>Bacillus subtilis</i>	34
1.3.5 Inductor de crecimiento	34

1.3.6 Antibióticos	36
1.3.7 Efectos directo sobre los patógenos.....	38
1.3.8 Resistencia inducida en plantas (SIR).....	39
1.3.9 Control de <i>Monilinia fructicola</i> (Wint) Honey con <i>Bacillus subtilis</i>	41
 CAPÍTULO 2 Control biológico de pudrición parda (<i>Monilinia fructicola</i>) (G. Winter) Honey), con dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en duraznero (<i>Prunus persica</i> [L.] Batsch	43
2.1 Materiales y métodos.....	43
2.1.1 Microorganismos	43
2.2.2 Identificación de los microorganismos	44
2.2.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	44
2.2.4 Material vegetal	46
2.2.5 Actividad antifúngica en frutos de duraznero	46
2.2.6 Análisis estadístico.....	48
2.3 Resultados	48
2.3.1 Identificación morfológica <i>Monilinia fructicola</i>	49
2.3.2 Identificación molecular <i>Monilinia fructicola</i>	50
2.3.3 Identificación <i>Bacillus</i> spp.....	50
2.3.5 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	53
2.3.6 Actividad antifúngica en frutos de durazno	56
2.2.7 Severidad.....	57
2. 4 Discusión	59
 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
4. ANEXOS	66
BIBLIOGRAFÍA.....	68

Lista de Tablas

Tabla 1. Listado fungicidas para el control de <i>Monilia spp</i> ,	29
Tabla 2. Mecanismos de biocontrol <i>Bacillus</i> spp para el control de patógenos.	33
Tabla 3. Insumos registrados ante el ICA y permitidos en la producción ecológica.....	35
Tabla 4. El efecto como biofertilizante de <i>Bacillus</i> spp. en cultivos.....	36
Tabla 5. <i>Bacillus subtilis</i> como inductor de resistencia contra patógenos.	40
Tabla 6. Distribución de los tratamientos, en prueba in vitro de <i>B. subtilis</i> vs <i>M. fructicola</i>	45
Tabla 7. Características diferenciales para la especie <i>Bacillus subtilis</i>	51
Tabla 8. Tasa y halo de inhibición de dos cepas de <i>B. subtilis</i> contra <i>M. fructicola</i>	54
Tabla 9. Tasa de inhibición y promedio de radio de la lesión causada por <i>M. fructicola</i> en frutos de duraznero tratados con dos cepas de <i>B. subtilis</i> (CB10 y CB11) y un fungicida ..	59

Lista de Figuras

Figura 1. Planta de duraznero (<i>Prunus persica</i>), CV. Dorado. Municipio Sotaquirá. Fuente M. Patiño (2019).....	17
Figura 2. Variedades de duraznero. De izquierda a derecha variedad. Dorado, Rey negro, Diamante. Rubidux y Jarillo. Fuente M. Patiño (2019).....	20
Figura 3. Estructuras de reproducción de <i>Monilinia</i> . A) estado asexual (anamórfo) <i>Monilia</i> , B) Estado (teleomórfo) sexual <i>Monilinia</i> . Fuente (Ulloa, 2019).....	26
Figura 4. Podredumbre parda <i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey en frutos de duraznero (<i>Prunus persica</i>) A) Fruto de la variedad dorado afectado por la pudrición parda Fuente: Yenny G. (2016). B) Flores afectadas por el patógeno C) Flores on atizonamientos. Fuente (Torres, 2012)	28
Figura 5. Control biológico de <i>Bacillus subtilis</i> en la filósfera. Fuente (Patiño, Bustamante, & Vásquez, 2012).	38
Figura 6. Diagrama de severidad para estimar el daño en frutos causados por Roña del manzano (<i>Venturia inaequalis</i>) adaptado para <i>Monilinia fructicola</i> . Fuente (Castaño Zapata, 2002, Pág 135-138).....	47
Figura 7. Frutos de duraznero variedad Dorado infectados por la pudrición parda <i>M. fructicola</i> , colectados de un huerto comercial. Fuente Patiño 2019.	49
Figura 8. Características morfológicas de <i>M. fructicola</i> , cepa (JEDO-107). (A y B) Crecimiento en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. (C) Conidios y conidióforos visto a (40x).....	50
Figura 9. Aislamientos (CB10 y CB11) de <i>Bacillus subtilis</i> (A) Bacterias después de la tinción de Gram bacilos gram positivos vistos a 100x para las cepas. (CB10 y CB11). (B) Crecimiento en Agar Nutriente después de 48 horas de la cepa CB10, (C) Crecimiento en Agar Nutriente después de 48 horas de la cepa CB11. Fuente: Autores (2019)	51
Figura 10. Pruebas bioquímicas de los, aislamientos (CB10 y CB11) de <i>Bacillus subtilis</i> (A) Prueba catalasa positiva. (B) Prueba de licuefacción de gelatina positiva. (C) Prueba de KOH 3% negativa, (D) crecimiento en agar nutritivo + NaCl 7% positivo, (E) Crecimiento en agar KB, negativo Y, por último (F) Crecimiento en Agar YDC, resultado negativo. Fuente: Autores (2019).....	53
Figura 11. Prueba in vitro de <i>Bacillus subtilis</i> para el control de <i>Monilinia fructicola</i> (JEDO-107). A) cepa CB10 de <i>B. subtilis</i> x <i>M. fructicola</i> , B) cepa CB11 <i>B. subtilis</i> x <i>M.</i>	

fructicola, C) Cepa CB10 de *B. subtilis*, D) Cepa CB11 de *B. subtilis*. Fuente: Autores (2019)..... 54

Figura 12. Tasa de crecimiento del aislamiento (JEDO-107) de *Monilinia frutícola* y de las cepas CB10 y CB11 de *Bacillus subtilis*. *Significado. Letras de diferentes presenta diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de *LSD* $P < 0,05$ 55

Figura 13. Método de inoculación de *Monilinia fructicola* en frutos de duraznero. A) Aislamiento de *Monilinia fructicola* en medio PDA. B) Frutos de duraznero variedad Dorado, C) Fruto desinfectado con una perforación. D) Inoculación con las cepas bacterianas E) Fruto inoculado con el aislamiento de *Monilinia fructicola* F) Montaje de cámaras húmedas. Fuente: Autores (2019)..... 56

Figura 14. Efecto antifúngico de cepas de dos aislamientos de *B. subtilis* (CB10 y CB11), y un fungicida (Dicloram) contra *M. frutícola* aislamiento (JEDO-107) en frutos de duraznero a los 3 y 6 días. A) Frutos inoculados con *M. fructicola* B) Frutos inoculados con agua destilada estéril. C) Frutos inoculados con la cepa CB11 de *B. subtilis* y *M. fructicola* D) Frutos inoculados con la cepa CB10 de *B. subtilis* y *M. fructicola*. E) Frutos asperjados con Dicloram y *M. fructicola*. Fuente: Autores (2019) 57

Figura 15. Porcentaje de severidad de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (JEDO-107) en frutos de duraznero, inoculados con dos cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11) y un fungicida (Dicloram). Fuente: Autores (2019) 58

Introducción

El cultivo del duraznero en Colombia es uno de los más representativos en el trópico alto, en especial en los departamentos de Boyacá, Norte de Santander y el Huila entre otros. La producción nacional de esta fruta para el año 2018 fue de 34.862 toneladas (AGRONET, 2019). En la actualidad se han establecido sistemas productivos tecnificados con variedades tempranas e intermedias, lo que les ha permitido a los productores programar las cosechas durante todo el año (AGRONET, 2019). Algunas condiciones que le dan esta ventaja a Colombia es: la ubicación en la zona tropical, la existencia de microclimas y el recurso hídrico (Castro & Puentes, 2012, p. 370-391). Pero, son las enfermedades y plagas las principales limitantes en producción de duraznero en cultivos establecidos.

La enfermedad fúngica más importante en el cultivo del duraznero es la “pudrición parda” que tiene como agente causal a *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. Este patógeno afecta ramas, flores y frutos, (Agrios 2005, p. 181-182). Está presente en todas las zonas productoras a nivel mundial causando pérdidas entre un 50 a un 70%, e incrementando el costo de producción (Agrios 2005, p. 181-182). En países como Hungría y Chile es considerado un patógeno cuarentenario (Petróczy, 2007; Torres, 2012).

Monilinia fructicola, es un patógeno que causa la pudrición parda en el duraznero y en otras especies de los *Prunus*. Su infección inicia con la producción de enzimas como las cutinasas y tóxicas; que se desarrollan muy rápidamente en células epidérmicas de los tejidos más susceptibles como; frutos, ramas y flores en donde el patógeno penetra directamente o por heridas (Agrios, 2005, p. 507-510). Posteriormente el hongo secreta enzimas como las pectinasas que causan la oxidación de compuestos fenólicos en los

tejidos susceptibles, hasta colonizarlos y cubrirlos con un denso micelio de color gris. La enfermedad es favorecida por la alta humedad en el ambiente y bajas temperaturas (Agrios, 2005, p. 235, 251).

En trabajos previos, han demostrado la efectividad de *Bacillus subtilis*, en el biocontrol de Fitopatógenos como *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, tanto en campo, como en poscosecha (Yáñez, *et al*, 2012; Wang, *et al*, 2018a). Uno de las sustancias producidas por esta bacteria para el control de este patógeno son: los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como el benzotiazol y el CF-3 24Hfb, que inhiben la acción de enzimas sobre los tejidos (Zhou, Li, & Wu, 2019). Otra sustancia que produce son los lipopéptidos en especial de la fengimicina, que tiene un efecto antifúngico, al debilitar la pared celular y causar daño en las vacuolas (Yáñez, *et al*, 2012). El uso de este biocontrolador se ha extendido ampliamente como acondicionador de suelos en diferentes cultivos sin afectar el microbioma del suelo (Wong *et al*, 2016); y controlando de patógenos de la raíz como en el cultivo de tabaco (You *et al*, 2016).

Otra particularidad de este biocontrolador es la capacidad de infectar y causar la mortalidad en las larvas del mosquito *Anopheles culicifacies*, que es el insecto vector primario de malaria en el centro de la India (Balakrishnan, Indira, Srinivasan, 2015). Es antagonica hacia muchos hongos patógenos de plantas, este control se da por varios mecanismos incluyendo la competencia de nutrientes, colonización de la rizósfera y la filósfera, *Quorum sensing*, la producción de: lipopéptidos, toxinas, sideróforos, enzimas líticas, antibióticos e induciendo la resistencia sistémica, por tanto, es considerado un eficiente agente de control biológico de plagas y enfermedades en plantas (Bent, 2006; García, Zeriuoh & Romero, 2013). El riesgo potencial asociado con el uso de esta bacteria

en los cultivos es bajo, en este enfoque el uso se orienta a la bioseguridad agrícola y en el uso en cultivos orgánicos (Levitus, *et al*, 2004, p. 102-107).

Bajo este contexto se desarrolló esta investigación que buscó evaluar el biocontrol de dos cepas (CB10 y CB11) de *Bacillus subtilis*, contra la pudrición parda causada por *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey en duraznero. Las cepas de *B. subtilis* se seleccionaron dentro de 32 aislamientos por su efecto antagónico contra otros hongos fitopatógenos. En pruebas *in vitro* se evaluó la tasa y halo de inhibición del patógeno. En frutos de duraznero se evaluó la tasa de crecimiento y la severidad de la enfermedad.

Los resultados mostraron en pruebas *in vitro* la cepa CB10 de *B. subtilis* registró una tasa de inhibición del 88, 5% y un halo de inhibición de 14 mm controlando el desarrollo del patógeno, en contraste la cepa CB11 que registro un menor control. En frutos inoculados con la cepa CB10 de *B. subtilis*, la tasa de inhibición del patógeno fue del 95% y la severidad menor del 10%, en comparación con los tratamientos evaluados. La cepa CB11 *B. subtilis* y el fungicida Dicloram, presentaron resultados similares una severidad promedio del 35% y una tasa de inhibición del 70%. Estos resultados son muy esperanzadores en la formulación de estrategias de manejo de enfermedades en plantas, más ecológicas que generen un mayor beneficio a productores y consumidores con productos más limpios.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la eficiencia de *Bacillus subtilis* cepas (CB10 y CB11) para el control biológico de *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honeyy en frutos de duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch).

Objetivos específicos

- Realizar una revisión de literatura actualizada del cultivo de duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch, la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) y de *Bacillus subtilis*.
- Evaluar el antagonismo de 2 cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11) contra *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey en pruebas *in vitro*.
- Determinar el efecto de la aplicación de dos cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11) y un fungicida en el control de *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, en frutos de duraznero.

Capítulo 1. Marco teórico. Generalidades del cultivo de duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch), la pudrición parda (*Monilinia fructicola* Honey ex Whetzel) y *Bacillus subtilis*

1.1 Duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch)

El duraznero es una especie de frutales caducifolios, y su nombre científico es “*Prunus persica* (L.) Batsch”. Como lo describe Castro & Puentes, (2012), p. 370-379. “Es un árbol arbusto de copa ovalada, con tronco de tamaño mediano con una corteza de color pardo, las flores son hermafroditas que cambian de color de un tono blanco hasta un rosado intenso”. Los frutos son drupas casi esféricas, con una piel pubescente, de colores variados desde un amarillo intenso hasta un verde, con tonalidades púrpuras a rojizas en el centro de los frutos se encuentran las semillas en forma de nuez, que puede estar adherida o separada de la pulpa del fruto (Cárdenas & Fischer, 2013, p. 21-28). (En la Figura 1 se muestra un árbol de duraznero de la variedad dorado en estado productivo).



Figura 1. Planta de duraznero (*Prunus persica*), CV. Dorado. Municipio Sotaquirá. Fuente M. Patiño (2019)

Esta planta es originaria de la China Septentrional y fue cultivada en Persia (Irán en la actualidad) y posteriormente introducida a Europa. Durante el descubrimiento de América en el siglo XVI, una gran cantidad de especies animales y vegetales dentro los que figuraba los frutales caducifolios fueron introducidos al nuevo mundo (Campos & Tarmín, 1991, p. 7-14). En Colombia las comunidades religiosas jugaron un papel muy importante en su expansión y su conservación desde la época de la colonia.

Por la ausencia de estaciones y localización en el trópico en Colombia, cultivos como los frutales caducifolios pueden programarse forzosamente empleando productos que simulen horas frío (defoliantes inorgánicos), así es como las plantas entran a un estado de latencia, por tal razón, se ha podido programar cosechas durante todo el año con cultivares con poco requerimiento de horas frío (Castro & Puentes, 2012, p. 370-379). La fruticultura de clima frío presenta ventajas como: el tipo de suelo, sistemas de riego, condiciones agroecológicas y la vocación agrícola donde se cultiva esta especie, lo que representa una gran ventaja para los productores (Castro & Puentes, 2012, p. 370-379).

Según The Plant List (2019), el melocotonero o duraznero tiene la siguiente clasificación taxonómica: Dominio Eucaria, Reino Plantae, División Magnoliophyta (Angiospermas), Clase Magnoliopsida (Dicotiledóneas), Orden Rosales, Familia Rosaceae, Subfamilia Prunoideae, Género *Prunus*, Especie *Prunus pérsica* (L.) Batsch (1801), Stokes 1812.

1.1.2 Producción

El mayor productor y exportador mundial de duraznero es China, seguido de Estados Unidos, La Unión Europea y Turquía. En América Latina se destaca países productores

como Chile, Argentina y Brasil (FAOSTAT, 2019). En Colombia para el año 2018 se produjeron 34.862 toneladas de esta fruta. Los principales departamentos productores fueron; Boyacá con 14.256 ton, lo que representa un (39%) en la producción nacional; Norte de Santander 9.946 ton (26%); Santander 4.364 ton (12%); Huila 4.027 ton (11%) y otros departamentos 16.29 Ton /Ha (12%) (AGRONET, 2019). La producción de duraznero se establece a una altitud entre los 950 a 2.500 msnm, temperaturas en promedios entre los 12 a 22°C, y precipitaciones entre los 1.000 y 2.000 mm/año (Castro & Puentes, 2012, p. 370-379).

1.1.3 Características de los suelos y requerimientos nutricionales

En plantas de duraznero el sistema radicular que es más superficial que otras especies caducifolios, diferentes expertos recomiendan suelos con buen drenaje para evitar la asfixia de las raicillas. Es una especie muy sensible a la sequía en regiones con escasa precipitación, es importante disponer de reservas hídricas o sistemas de riego. Los suelos más recomendables son los limosos y con buen drenaje. Este cultivo se adapta a pH entre 4.5 – 6, los requerimientos nutricionales varían según el ciclo productivo (Campos & Tarmín, 1991, p. 7-17).

1.1.4 Variedades

Los durazneros se clasifican de acuerdo a la presencia de tricomas en la piel y por la adherencia de la pulpa a la semilla de esta forma se clasifican como (*Prunus pérsica* L), en cambio, los melocotoneros también llamados priscos presentan una piel aterciopelada, pero la pulpa no se adhiere a la semilla (Cárdenas & Fischer, 2013, p. 21-29). Otro grupo son los nectarinos (*Prunus pérsica* var. *nectarino*) que presentan una piel lisa y la pulpa no se une a la semilla (Olarte, 1991, p. 17-24; Cárdenas & Fischer, 2013, p. 21-29). Las variedades que

se cultivan en el Departamento de Boyacá (Colombia) son los que se describen a continuación. En la Figura 2 se muestran las diferentes variedades de duraznero que se producen en Colombia.



Figura 2. Variedades de duraznero. De izquierda a derecha variedad. Dorado, Rey negro, Diamante, Rubidux y Jarillo. Fuente M. Patiño (2019)

- **Blanco común.** Presenta frutos de tamaño mediano, color amarillo, sabor insípido y es utilizado como patrón para otras variedades de duraznero. Su adaptación altitudinal esta entre los 1.800 -3200 (msnm), requerimiento horas frio (RQH) es de 200 a 400.
- **Dorado.** Los frutos son de piel amarilla con pintas rojas, son casi redondos de tamaño grande, y sabor dulce. Posee buenas características para utilizarlo en la industria. Su adaptación altitudinal esta entre los 2.400 -3.000 (msnm), (RQH) 300.
- **Diamante.** Los frutos presentan una piel rojiza, la pulpa es de color amarillo, su tamaño es mediano, y presenta una punta en la base. Es una variedad altamente productiva. Su adaptación altitudinal esta entre los 2.400 -3.000 (msnm) y un (RQH) 200.
- **Rey negro.** Es un melocotón, los frutos son de piel verde a rojiza, con un pezón muy pronunciado. La pulpa es de color blanco con tonalidades rojizas cerca de la

semilla, de tamaño mediano y las cosechas son tempranas. Su adaptación altitudinal esta entre los 2.000 -2.700 (msnm) y (RQH) 350 a 450.

- **Rubidúx**, es un melocotón, sus frutos son de color amarillo, y con tonalidades rojizas cerca de la semilla. Es de forma redondeada y tamaño grande. Buen comportamiento poscosecha. Adaptación altitudinal esta entre los 2.400 -2.800 (msnm) y (RQH) 500 a 700.
- **Gran Jarillo**, frutos de piel rojiza con tonalidades amarillas. Forma redondeada y de tamaño mediano. Buen comportamiento poscosecha. Los árboles son de gran tamaño. Adaptación altitudinal esta entre los 1800 a 2200 (msnm) y (RQH) 500 a 700.

1.1.5 Aspectos fenológicos del cultivo

Los caducifolios tienen un crecimiento periódico o en ciclos. Las plantas inician con un periodo juvenil en él que se caracteriza por un crecimiento vegetativo (con ausencia de flores), esto puede durar de dos a tres años dependiendo la variedad injertada y el porta injerto. La siguiente etapa es la defoliación, esta ocurre naturalmente o por la aplicación de algunos productos químicos como: oxiclورو de cobre (110/20 L) + sulfato de Zinc (150-200 g/20 L). y dependiendo del clima se puede utilizar clorato de sodio (defoliante inorgánico). De esta forma utilizando estos productos se pueden inducir a este estado, lo que permite programar las cosechas (Castro & Puentes, 2012, p. 379).

Continuando con el ciclo productivo el siguiente estado es la dormancia, en este se recomienda aplicar la cianamida hidrogenada (Dormex), que es un regulador de crecimiento o compensador de frio. Durante este periodo inactivo de crecimiento o reposo, se realizan las podas sanitarias y de formación del árbol. La siguiente etapa es el desarrollo

e hinchamiento de las yemas, también se recomienda aplicación de fungicidas y bactericidas para el control de diferentes enfermedades en el cultivo. Por último, ocurre el periodo de floración en el que es crucial la fertilización para el cuajamiento de los frutos, su crecimiento y desarrollo, así garantizar una mayor la calidad de las cosechas (Castro & Puentes, 2012, p. 377).

1.1.6 Enfermedades

Dentro de las enfermedades más importantes en el cultivo de duraznero según Buriticá (1999), p. 106-107 son: las que afectan las hojas como: Torque de las hojas, (*Taphrina deformans* Berk), tiro de munición (*Coryneum carpophyllum* Lev) y la roya (*Tranzschelia discolor* (Fuckel). Los frutos son afectados por la pudrición café (*Monilinia fructicola* Honey, anamorfo *Monilia fructicola*), cenicilla del durazno (*Sphaerotheca pannosa*, anamorfo *Oidium leucoconium* Desmaz), sarna (*Venturia carpophila* Fischer anamorfo *Cladosporium carpophyllum* Thue) y gomosis (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith) Dye). En tallos y raíces se puede observar chancros en la corteza causado por: (*Nectria galligena* Bres, anamorfo (*Cylindrocarpon heteronemum* (Berk y Broome) Wollenweb) y la agalla de la corona (*Agrobacterium tumefasciens* (E.F. Smit and Towns) Conn.

Una nueva enfermedad denominada muerte descendente del duraznero, se identificó en dos municipios en el departamento de Caldas (Colombia), su agente causal es *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Causó una incidencia del 100% en 4 variedades de duraznero (Amarillo, Sapote, Newball y Florida). La enfermedad se caracteriza por flacidez en hojas, defoliación, muerte de ramas y exudados de goma en los tallos. Los síntomas se desarrollan más rápido en condiciones de alta humedad (Rivera & Castaño, 2011).

1.2 *Monilinia*

Como describe Agrios, (2005), p. 507-510 “La pudrición morena o *Monilinia* spp, es la enfermedad más importante a nivel mundial en los cultivos de duraznero (*Prunus pérsica* L. Batch), nectarines (*Prunus nucipersica* P. Gaertn., Mey & Scherb), cerezas (*Prunus avium* (L.) L”. Recientemente en ciruelo (*Prunus salicina* Lindl), como hospederos alternos tiene al Damasco (*Prunus armeniaca* Marshall) y al almendro (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Weebb). Su mayor incidencia se registra en periodos de alta humedad, en especial en las etapas de floración y maduración de los frutos. Se registra pérdidas entre el 50 al 70% en los cultivos causado por este patógeno (Agrios, 2005, p. 510). Se presenta en todas las zonas productoras de durazneros, el patógeno afecta a los tallos, flores y frutos hasta la poscosecha Agrios, 2005, p. 251).

Existen diferentes especies de *Monilinia* spp, como agentes causales de la pudrición morena en frutos y flores de duraznero y nectarinos en todo el mundo. En Europa esta reportado a *M. laxa* y *M. fructígena* afectando estos cultivos (Abarca R, *et al*, 2017, p. 97-101). En Norte América, Sur América, en algunos lugares de África y Asia, esta reportado *M. fructicola*, que es la especie más destructiva causando tizones en flores y ramas, así como la pudrición morena en los frutos (Bryde, & Willetts, 1977 p. 30-49). Mientras que *M. laxa* es considerada un problema en almendros y caducifolios causando tizones en flores y en ramas (Hrustic, *et al*, 2015).

En Hungría el Departamento de Patología vegetal reportó a *M. fructicola*, como un patógeno cuarentenario ante el ente regulador de plagas y enfermedades para Europa “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO, 2009). También esta reportado por el Subdepartamento de Sanidad vegetal de Chile (Torres, 2012). En cambio

M. fructígena, es considerada cuarentenaria en Estados Unidos y Australia (Zhu, Chen, & Guo, 2011). Existe reportes de una nueva especie en Hungría *M. polistroma* aunque, no se ha determinado su importancia en el cultivo de los caducifolios (Petróczy, & Palkovics, 2009).

Trabajos hechos por Guarín, Patiño, & Martínez, (2019), identificaron las especies de *Monilinia* que afectan las variedades Dorado, Rubidoux, Diamante y Rey negro en el Departamento de Boyacá (Colombia). Los resultados mostraron que los frutos presentaban una pudrición generalizada que finalizaba con su momificación, en las flores causaba tizones y caídas de pétalos. Se identificó como los agentes causales de la pudrición morena a *Monilinia fruticola* en un 62.55%, con una mayor incidencia y severidad en los síntomas en campo, *Monilinia fructígena* un 25%, y *Monilinia* spp un 12,5% de un total de 32 muestras. En pruebas moleculares y según los resultados en la base de datos del NCBI, de las secuencias alineadas con otras de mayor similitud confirmó la identidad de los aislamientos de *M. fruticola* y *M. fructígena*.

1.2.1 Clasificación

Monilinia es un género que se clasifica según (Index fungorum, 2019) en: el Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Leotiomycetes, Orden Helotiales, Familia Sclerotiniaceae, Género *Monilinia*, como sinonimias tiene a; *Sclerotinia fruticola*, Especies *Monilinia fructígena* (Honey 1936); *Monilinia fruticola* (G. Winter) Honey (1928) y *Monilinia laxa* (Aderh. y Ruhland, 1945) Honey. *Monilinia* es un patógeno facultativo, que puede aislarse en medios de cultivo, causa momificaciones (pérdida de agua de los tejidos) y después causa necrosis (muerte de los tejidos del huésped) (Cepero, 2012). Es un microorganismo mitospórico o conidiales, que comparte características

morfológicas con otros hongos. En Colombia solo se presenta el estado asexual (anamorfó), se caracteriza por la producción de abundantes conidios y conidióforos de color gris que cubre los tejidos afectados, pero no se presenta el estado sexual que corresponde a *Monilinia* (Cepero, 2012, p. 199-200).

En países con estaciones este fitopatógeno puede reproducirse sexual y asexualmente (pleomorfismo). El estado sexual o telemorfo es *Monilinia* produce ascosporas y esclerocios. El estado asexual forma conidios y conidióforos corresponde a *Monilia*. La invasión del patógeno ocurre a través de las lenticelas de los frutos, picaduras causadas por insectos o heridas. El micelio se propaga a través de los tejidos del huésped destruyendo las paredes celulares, por la acción de enzimas en especial de la pectinasa y la cutinasa. (Traigiano, Windham, & Windham, 2004, p. 131).

1.2.2 Morfología

Como lo describe Llácer, *et al*, (2000), p. 885- 890. “Las colonias del género *Monilinia* se caracterizan porque generalmente son: de color café, beige o gris, con textura aterciopelada o pulverulenta, con bordes ondulados y crecimiento lento (1-2 mm/día)”. Visto en el microscopio el micelio vegetativo es septado, de color gris y delgado donde se forman los conidióforos ramificados, de donde se desprenden los conidios, que presentan una forma de limón formando cadenas y miden aproximadamente (9-22 x 5-13 μm) (Ulloa, 2019). Durante el estado sexual *Monilinia*, forma. apotecios que son: pedicelados en forma de embudo, de color marrón o vino tinto, en su interior hay numerosos ascos unitunicados con ocho ascosporas, que son de forma elipsoidal y aplanada de un solo lado (Cepero, 2012, p. 199-200).

Este patógeno también produce esclerocios que son una masa compacta de hifas sobre frutos momificados, son estructuras de resistencia (Castaño Zapata, 2015, p. 159) (En la Figura 3 se muestra las estructuras reproductivas desarrolladas por *Monilinia* spp).

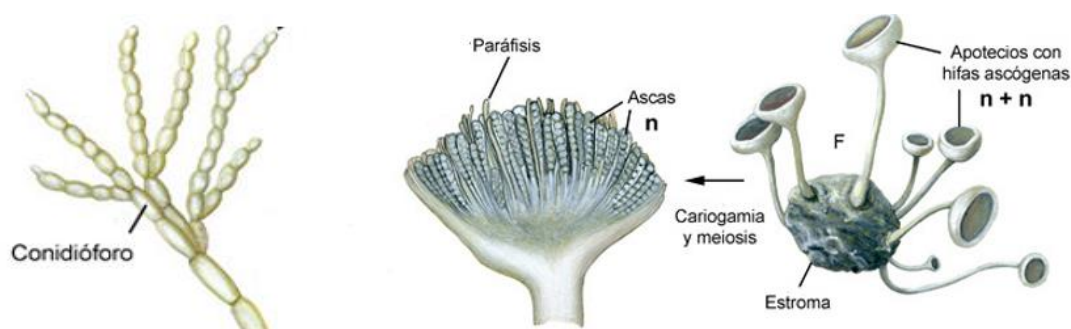


Figura 3. Estructuras de reproducción de *Monilinia*. A) estado asexual (anamórfo) *Monilia*, B) Estado (teleomórfo) sexual *Monilinia*. Fuente (Ulloa, 2019)

1.2.3 Desarrollo de la enfermedad

Como lo describe Agrios, (2005), p. 507, este patógeno desarrolla sus estructuras de reproducción (conidios) sobre: frutos momificados, chancros, ramas, y en flores afectadas. Los apotecios se desarrollan sobre los esclerocios y frutos momificados, durante la primavera. Las estructuras de reproducción como las ascosporas y conidios se mueven por viento, agua entre otros, pueden iniciar una nueva infección en tejidos susceptibles. Los primeros en infectarse por lo general son las flores, donde germinan las esporas durante unas horas formando cadenas de hifas, que rompen la epidermis se proyectan al exterior formando masas de conidios que más adelante afectarán a las ramas y a los frutos.

Según Agrios, (2005), p. 510, las condiciones favorables para la infección son periodos prolongados de lluvias y temperaturas entre los 10° a 25°C, que coincidan con los periodos de floración y fructificación. Los frutos son más susceptibles en el estado de maduración, la penetración de patógeno ocurre a través de heridas o por aberturas naturales como los

estomas o por la cutícula. El hongo se desarrolla intercelularmente secretando enzimas que causan una pudrición de los tejidos, sobre las lesiones se proyecta el micelio que se desarrolla con una gran rapidez. Los frutos afectados terminan en un total estado de descomposición, pueden caer al suelo o quedar adheridos a las plantas, transformándose en momias deformadas y secas en donde se encuentran abundantes hifas y conidios del patógeno que son la fuente de inóculo (Agrios, 2005, p. 510). En poscosecha los frutos infectados al estar en contacto frutos sanos pueden infectarse con el patógeno.

1.2.4 Síntomas

Como lo menciona Agrios, (2005), p. 507, los primeros síntomas del patógeno se observan en las flores con marchitamiento y tizones. En los tallos y ramas se pueden desarrollar gomas y chancros. En los frutos los síntomas se presentan cerca al periodo de maduración, se observan manchas de color marrón de forma circular de crecimiento rápido que cubre la totalidad del fruto, sobre las manchas se observa masas de conidios de color ceniza. Por último, causa una pudrición generalizada que finaliza con la momificación de los mismos (Llácer, *et al*, 2000, p. 885-890).

Los síntomas causados por la pudrición marrón en los frutos (*brown rot*), se manifiestan por la degradación de la celulosa, hemicelulosa, lo cual cambia su estructura y apariencia. En la etapa de maduración de los frutos son más susceptibles por la presencia de azúcares solubles, pectinas y prolinas y menos fenoles, protopectinas, por ello, son más sensibles a podredumbres (Agrios, 2005, p. 507). Algunos patógenos que causan momificaciones son principalmente son algunos Basidiomycota y algunos Ascomycota dentro de este grupo está el género *Monilinia*. (En la Figura 4 se muestran los síntomas causado por este patógeno en el duraznero).

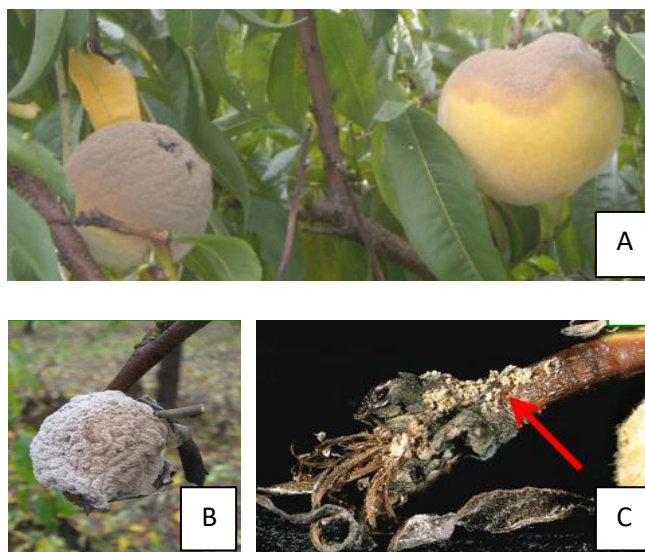


Figura 4. Podredumbre parda *Monilinia fructicola* (Winter) Honey en frutos de duraznero (*Prunus persica*) A) Fruto de la variedad dorado afectado por la pudrición parda Fuente: Yenny G. (2016). B) Flores afectadas por el patógeno C) Flores on atizonamientos. Fuente (Torres, 2012)

1.2.5 Control químico

El manejo de esta enfermedad se realiza con la aplicación de productos químicos, controles físicos y culturales como: podas sanitarias y raleo de frutos afectados. El control químico se realiza con la aplicación de fungicidas durante la etapa de floración y caída de pétalos hasta la formación de los frutos. Dentro de los productos más utilizados se encuentran fungicidas de contacto como: Captan, Cloratonil, y fungicidas sistémicos como Trifloxystrobin, Tebuconazole y Fenhexamid.

Dentro de las recomendaciones hechas por el Comité Internacional de Manejo de Resistencia a Fungicidas (FRAC, 2019), mencionan que los fungicidas utilizados para el control de patógenos deben ser aquellos que sean de diferente modo de acción y la dosis recomendada por el fabricante, evitando la subdosis o la sobredosis lo que resulta para el primer caso, en una cobertura y una penetración incompleta en el tejido vegetal y en el segundo caso intoxicaciones en las plantas (Dowling, *et al*, 2016). (En la Tabla 1 se mencionan los principales fungicidas utilizados para el control de *Monilinia* spp).

Tabla 1. Listado fungicidas para el control de *Monilia spp*,

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Periodo de aplicación	Riesgo de resistencia
Trifloxystrobin	Oximino-acetates	Inhibición de la Respiración Inhibidor de la Quinoonas	Floración y cuajado de fruto y previo cosecha (hasta 2 veces).	Alto riesgo de resistencia C3
Piraclostrobina	Methoxycarbamates			
Azoxistrobina	Methoxy-acrylates			
Tebuconazole	Triazoles	Inhibe biosíntesis del esterol.	Floración y cuajado de fruto y previo cosecha (hasta 2 veces).	Bajo a medio riesgo de generar resistencia G2
Fenhexamid	Hydroxyanilides			
Dicloran	Aromaticohydrocarbono	Inhibición de la síntesis de lípidos y alteración de la membrana celular	Floración y cuajado de fruto y previo cosecha (hasta 2 veces).	Bajo a medio riesgo de generar resistencia F3
Captan	Phthalimides	Multisítio	Desde botón floral hasta caída de pétalos	Riesgo bajo de generar resistencia M04 y M05
Cloratonil	Chloronitriles			
Ciprodinilo	Anilino-pyrimidines	Inhibición de la síntesis de aminoácidos y proteínas	Floración y cuajado de fruto y previo cosecha (hasta 3 veces).	Riesgo medio de resistencia D1
Fludioxonil	Phenylpyrrole	Inhibición de las señales de transducción	Tratamiento de post cosecha	Bajo a medio riesgo de generar resistencia. E2

Fuente: (FRAC, 2019)

En investigaciones hechas por Schnabe, *et al*, (2014), determinaron la resistencia de *Monilinia fructicola* a fungicidas como azoxistrobin, comprobaron cuando se manejan una menor dosis de la recomendada por el fabricante, causa una mutagénesis al acelera los procesos genéticos en la población en general. Una menor dosis causa estrés y una mutación en el DNA, lo que provoca cambios en los transposones por la generación de oxígeno radioactivo. Lo que demuestra, es que los fungicidas sistémicos que afectan un solo modo de acción, sin un adecuado manejo se pueden generar una pérdida en la sensibilidad del producto por parte del patógeno.

En un estudio reciente evaluaron la resistencia de *Monilinia fructicola* a niveles subdosis de azoxistrobin en pruebas *in vitro*, se evidencio una mutación en el loci SSR y cambios en los transposones *Mftc1* (Chen, *et al*, 2015). Estos estudios demostrarían el alto riesgo que presentan estos productos en el desarrollo de resistencia por parte de *M. frutícola* (Grimmer, *et al*, 2015). Algunos reportes indican que los fungicidas pueden producir cambios genéticos bajo una exposición continua en campo y una pérdida de sensibilidad del

producto cuando se maneja una subdosis del producto. Según la FRAC (2019), clasifica a *Monilinia* como un patógeno que presenta un riesgo medio en generar resistencia a los fungicidas.

El uso excesivo de pesticidas, ha generado efectos negativos en el medio ambiente, por la contaminación de suelos, fuentes hídricas, alimentos, y perjudica también a la salud humana. Uno de los fungicidas más utilizados en el control de *Monilinia* en duraznero es Captan, recientemente se ha prohibido su uso por su efecto cancerígeno en México y en otros países (Arellano, & Rendón, 2019).

1.2.6. Controles alternativos

Dentro de los controles alternativos que existe para la pudrición parda (*Monilinia frutícola*), se encuentran la aplicación de productos como fungicidas de síntesis química, como Fludioxonil y el manejo de una temperatura entre los 4 a 6°C (Llácer *et al*, 2000, p. 967-980; Mari, *et al*, 2008; Cassal, *et al*, 2010a).

En la actualidad, se busca reducir el riesgo asociado a la aplicación de fungicidas al medio ambiente y a la salud humana. Investigaciones recientes han buscado nuevas alternativas de control de esta enfermedad, como es el tratamiento con agua caliente en frutos cosechados (Mari, *et al*, 2007), la exposición a luz ultravioleta (UVV) (Lu, *et al* 1991), y el uso de sustancias como glucosinolatos derivados de isotiocinatos y ácido paracético (Mari, Gregori, & Donati, 2004; Mari *et al*, 2008). Otros tratamientos son con el bicarbonato de sodio y agua caliente (Cassal, *et al*, 2010b, Cassal *et al*, 2010c), lo que ha permitido controlar al patógeno sin efectos duraderos. Lo que implica que puedan desarrollarse nuevas infecciones si los frutos al entran en contacto con frutos enfermos. Algunos de estos productos cambian la apariencia y sabor de los frutos.

1.2.7 Control biológico

En la actualidad, el control biológico es una nueva estrategia de manejo de plagas y enfermedades en plantas empleando microorganismos e insectos que actúan como antagonistas, depredadores o parasitoides denominados “bioplagicidas”. Se considera una alternativa sostenible al uso de pesticidas sintéticos. Dentro de estos se destacan las bacterias que ejercen efectos positivos en el crecimiento de las plantas y como controladores biológicos. Dentro de estas una de las más estudiadas es *Bacillus subtilis*, que se reporta como un inductor en el crecimiento vegetal y biocontrolador de numerosos patógenos que afectan las hojas (filósfera superficie de las hojas) y las raíces en especial en (la rizósfera superficie e interior de las raíces) de las plantas (Rudrappa, *et al*, 2008).

1.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus es un género son bacterias cosmopolitas distribuidas en todos los agro-ecosistemas. En la actualidad se emplean en la bioremediación de los suelos y acuíferos, como agentes de biocontrol de fiopatógenos e inductor de la resistencia a enfermedades, y como probiótico (Akram, Mahboob, & Javed, 2013). Su especificidad en el control de patógenos depende de la producción de: bactericidas, toxinas, enzimas, antibióticos y sideróforos que limitan el crecimiento y desarrollo de los patógenos. Otro mecanismo que realiza para el control es por la competencia de nutrientes y por exclusión de espacio (Ramírez & Kloepper, 2010).

Como lo describe Realpe, Hernández, & Agudelo, (2002), p. 106-109 “en medios de cultivo *Bacillus subtilis* desarrolla colonias de 2 a 4 milímetros de diámetro, de color blanco, de aspecto mucoide y bordes rugosos u ondulados y de olor fuerte”. Las bacterias vistas en el microscopio son de forma bacilar, en el interior de estas presenta una endospora

casi esférica en la parte central, son bacterias que se clasifica como gram positivas y catalasa positiva.

1.3.1 Clasificación

Según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2019) clasifica a *Bacillus subtilis* en el dominio Bacteria, Filo firmicutes, Clase Bacili, Familia Bacillaceae, Género *Bacillus*, Especie *subtilis*. Según Mandigan & Parker, (2001) p. 423, 519, 725, la describe como “una bacteria resistente al calor que desarrollar una estructura de resistencia llamada endóspora. Tiene un DNA conformado por un cromosoma y tamaño de su genoma es 4.214.810 pb”. Este microorganismo se emplea en la transformación genética, ya que cuenta con secuencias de reconocimiento de algunas endonucleasas de restricción, se designa como *BsuRI*. Las enzimas de restricción son una herramienta, que permite el corte dentro de ellas en una región particular del DNA en procesos de recombinación genética.

1.3.2 Características

Bacillus subtilis presenta flagelos monótricos, crece en pH neutros (neutrófila), se desarrolla en temperaturas entre los 30 a 45°C. Produce enzimas dentro de las más importantes esta las hidrolasas y lipasas (Mandigan *et al*, 2001, p. 423). Crece en medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes como fuente de carbono, amoníaco como fuente de nitrógeno y es capaz de hidrolizar el almidón. Esta bacteria se clasifica como anaerobio facultativo (Mandigan *et al*, 2001, p. 423).

1.3.3 Mecanismos de biocontrol

El control biológico de enfermedades es un nuevo enfoque para el manejo de enfermedades en cultivos de interés. En estos últimos años, se ha estudiado el efecto de las

aplicaciones de cepas de *Bacillus subtilis* en la rizósfera y filósfera de las plantas, en donde se ha podido constatar que esta bacteria se comporta como un simbiote al producir biopelículas que cubren toda la superficie y evitan la invasión de agentes patógenos (Rudrappa *et al.* 2007). (Algunos ejemplos de mecanismos de biocontrol que desarrolla *Bacillus* spp. para el control de patógenos se mencionan en la Tabla 2).

Tabla 2. *Mecanismos de biocontrol Bacillus spp para el control de patógenos.*

Mecanismo	Cepa	Planta/patógeno	Evaluación	Referencias
Antibiosis/competencia	<i>B. subtilis</i> CPA-8	Durazno <i>Monilinia</i> spp	Poscosecha	Casals, <i>et al</i> , 2010c
Antibiosis	<i>B. subtilis</i>	Durazno <i>Monilinia fructicola</i>	In vitro	Yanez, <i>et al</i> , 2012
Antagonismo	<i>B. methylotrophicus</i>	Durazno <i>Monilinia fructicola</i>	In vitro y Poscosecha	Yuan, <i>et al</i> , 2019
Producción de lipopéptidos	<i>B. subtilis</i> GA1	<i>Botrytis cinérea</i> en frutos de manzano	In-situ	Touré, <i>et al</i> , 2004; Onega & Jacques, 2008
Quorum quenching	<i>Bacillus</i> spp	<i>Erwinia carotovora</i>	In vitro	Dong, <i>et al</i> , 2000, Li <i>et al</i> , 2013
Formación de biopelículas	<i>B. subtilis</i> FB17	Patógenos de las raíces	En invernadero	Rudrappa, <i>et al</i> , 2007
Producción de antibióticos	<i>B. subtilis</i> RB14	Tomate <i>Rhizoctonia solani</i>	Cámara de crecimiento, suelo	Asaka, & Shoda, 1996
Producción de metabolitos secundarios	<i>Bacillus</i> spp. <i>B. amyloliquefaciens</i>	Enfermedades bacterianas, podredumbres	En cámaras de crecimiento, cereza	Raaijmakers & Mazzola 2012, Gotor <i>et al</i> , 2017
Inducción resistencia sistémica adquirida	<i>B. subtilis</i> GB03, <i>B. thuringiensis</i>	Arabidopsis, <i>Erwinia carotovora</i>	Cámara de crecimiento, suelo	Ryu, <i>et al</i> , 2004, Ahmed <i>et al</i> , 2016, Akram, Mahboob, & Javed, 2013

Los mecanismos empleados por este microorganismo para el control de fitopatógenos tienen un efecto directo, con la producción de bacteriocidas, antibióticos, sideróforos, toxinas, por competencia por espacio o nutrientes, y el parasitismo (es la acción enzimas que degradan la pared celular hifas de los hongos como las quitinasas) (Yan, *et al*, 2011). De una forma indirecta, al favorecer la promoción del crecimiento de las plantas (PGP) con

la producción de fitohormonas, la solubilización de nutrientes y en la inducción de la resistencia sistémica inducida (SIR) (Cao, *et al*, 2012; Li, *et al*, 2013). Esto se explica porque, esta bacteria es altamente competitiva y se ha utilizado como un agente de biocontrol y este efecto lo mantienen a lo largo de su ciclo de crecimiento.

1.3.4 Productos registrados en Colombia para *Bacillus subtilis*

En Colombia ya se cuenta con numerosos productos biológicos cuyo ingrediente activo es *Bacillus subtilis*. Se utiliza como un agente microbiano para el control biológico de patógenos o como inoculante biológico para la promoción del crecimiento vegetal. Se presenta en formulaciones como concentrado soluble o emulsionable, polvo mojable y gránulos dispersables. En algunos casos se combina con otros microorganismos. (En la Tabla 4, se muestra algunos ejemplos de productos registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

1.3.5 Inductor de crecimiento

Esta bacteria permite la fijación del nitrógeno, la solubilización del fósforo, la producción de sideróforos y fitohormonas, lo que favorece el crecimiento de las plantas. Debido a su rápido crecimiento mejora la funcionalidad y composición del microbioma en el suelo y de la filósfera (You, *et al* 2016). Como describe Wang, *et al.*, (2018a) p. 225-250, “otros efectos positivos que se ha demostrado es que promueve el crecimiento de las plantas por la producción de fitohormonas como las (auxinas, citoquininas, giberelinas y el etileno), junto con la mineralización de nutrientes como, por ejemplo: la solubilización de fosfatos, Potasio y Zinc”. Algunas especies de *Bacillus*, son capaces de producir toxinas, y controlar larvas de insectos en cultivos como en el arroz y en el maíz (Lillian, 2006, p. 16, 204).

Tabla 3. Insumos registrados ante el ICA y permitidos en la producción ecológica

Nombre Comercial	Materias Primas Ingrediente Activo	Clase	Formulación	Blanco Biológico	Tipo De Producto
ACTIFOS SL MYCROS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>B-licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>	Inoculante biológico	Concentrado Soluble (SI)	Inoculante	Bioinsumo
BACTOX WP	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente Microbiano	Polvo Mojable (Wp)	<i>Botrytis cinérea</i>	Bioinsumo
ECOTERRA WG	<i>Azotobacter Chroococcum</i> , <i>P. Aureofaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	Inoculante biológico	Gránulos Dispersables (Wp)	No Aplica	Bioinsumo
RHAPSODY® 1.34 SC	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente De Control biológico	Suspensión Concentrada (Sc)	(<i>P. Infestans</i>) (<i>S. Pannosa</i>)	Bioinsumo
SERENADE® 1.34 SC	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente De Control biológico	Suspensión Concentrada (Sc)	(<i>M. Fijensis</i>) En Banano y (<i>R. Solani</i>) En Arroz	Bioinsumo
PROPHYTEX EC	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente De Control biológico (Agente Microbiano)	Concentrado Emulsionable (Ec)	Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella Fijensis</i>)	Bioinsumo
SUBTICROP SL®	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente De Control biológico	Concentrado Soluble (SI)	<i>M. Fijensis</i> y en Rosa <i>S. pannosa</i>	Bioinsumo

Fuente (MADR, 2019)

En las plantas inoculadas con la bacteria se observa mayor crecimiento y biomasa en hojas y raíces. En suelos con bajos contenido de hierro esta bacteria tiene la capacidad de producir sideróforos 2 (3- dihidroxibenzoil glicina, treonina éster trimérico bacilibactina), que mejora la absorción de este elemento por parte de las raíces (Yu, *et al*, 2011). Es un importante inductor de crecimiento vegetal al solubilizar nutrientes y en la producción de fitohormonas (En la Tabla 4 se citan ejemplos como esta bacteria se ha utilizado como un biofertilizante en diferentes cultivos).

Tabla 4. El efecto como biofertilizante de *Bacillus* spp. en cultivos

Especie de <i>Bacillus</i>	Favorecimiento del crecimiento	Referencias
<i>B. subtilis</i> ; <i>B. methylotrophicus</i>	Incrementa la longitud y la biomasa de raíces y hojas	Barnawal, <i>et al</i> , 2016; Radhakrishnan, & Lee, 2016.
<i>B. megaterium</i> ; <i>B. subtilis</i>	Incrementa el rendimiento de las cosecha y frutos cosechados	Kilian, <i>et al</i> , 2000; Dursun, Ekinci, & Donmez, 2010
<i>B. subtilis</i> ; <i>B. methylotrophicus</i>	Síntesis de hormonas de crecimiento (IAA, citoquininas y espermidinas)	Arkipova, Veselov, & Melentiev, 2005; Xie, <i>et al</i> , 2014; Radhakrishnan, & Lee, 2016.
<i>B. subtilis</i> ; <i>B. mojavensis</i>	Secreta ACC desaminasa para inhibir la senescencia de las plantas	Xu, <i>et al</i> , 2014; Pourbabaee, <i>et al</i> , 2016.
<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>	Solubilización de fosfatos	Toro, Azcon , & Barea, 1997; Kang, <i>et al</i> , 2014.

1.3.6 Antibióticos

Son los productos desarrollados por los microorganismos que limitan el crecimiento y desarrollo de otros. Son principalmente proteínas (enzimas), o péptidos, se pueden sintetizar en el ribosoma o en otro orgánulo, Dentro de ellos están los lipopéptidos, estructuralmente péptido cíclicos unido a una cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino, tienen una importante función para la bacteria en procesos celulares como: la antibiosis, la formación de biopelículas y la motilidad (Villarreal, *et al*, 2017).

Lipopéptidos (biosurfactantes), no-ribosomales son los más importantes, se clasifican como: surfactinas con efecto antibacterial. antiviral y antimicoplásmico (Meena & Kaanwar, 2015), iturínas tiene un efecto altamente antimicótico y antibacterial (Wang, *et al.*, 2015) y fengicinas que limita el crecimiento de hongos filamentosos, alterando la estructura de la membrana celular provocando a formación de poros y un desbalance osmótico (Radhakrishnan, *et al*, 2017). Es importante resaltar que existe un sinergismo entre fengimicina y la iturina lo que incrementa su efectividad en el biocontrol de fitopatógenos (Onega & Jacques, 2008). Recientemente se ha podido establecer que

lipopéptidos (LPs), altera otras funciones celulares en otros microorganismos fitopatógenos produciendo homeostasis intracelular del calcio, alteración en la síntesis del RNA, y en el metabolismo celular (Zhang, *et al*, 2016).

Otros compuestos que desarrolla *Bacillus subtilis* son los llamados bacteriocidas. Como los describe Mandigan *et al*, (2001), p. 403. “Esta bacteria produce compuestos que matan o inhiben otras especies estrechamente relacionadas. Son de 4 tipos (I - IV) tienen un espectro de acción más amplio”. Son péptidos producidos en los ribosomas con algunas modificaciones postraduccionales. Los genes que codifican a estos productos se encuentran en plásmidos. Produce *subtilisinas* que se unen a receptores específicos sobre la superficie de células susceptibles, este producto mata a las células alterando funciones vitales, he inhibe el crecimiento en un amplio espectro en especial en bacterias fitopatógenas (Mandigan, *et al*, 2001, p. 403). Las más representativas son Lantibioticos, (tipo A y B) que tiene una amplia actividad antimicrobial (Kumar, 2012).

A mismo esta bacteria produce antibióticos que son: metabolitos secundarios como, los polyketidos como Bacillaena, que inhiben la síntesis de proteínas en procariota, un ejemplo es macrolatina que es un inhibidor de la deformilasa en *Staphylococcus aureus* (Wang, *et al.*, 2015). Otros productos son los terpenoides, fitohormonas y las issocumarinas. Y, por último, proteínas como las bacisubina y fosfolípidos como bacilysocina tienen efecto bactericida y fungicida (Wang, *et al.*, 2015). (En la Figura 5 se menciona los mecanismos utilizados por *B. subtilis* para el control de agentes infecciosos).

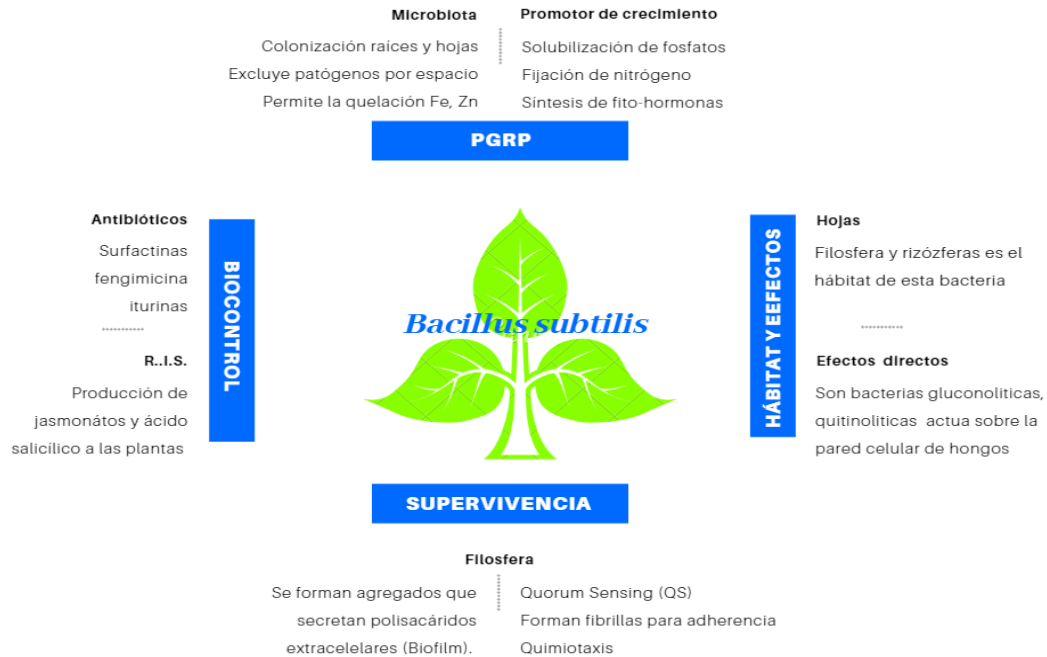


Figura 5. Control biológico de *Bacillus subtilis* en la filósfera. Fuente (Patiño, Bustamante, & Vásquez, 2012).

1.3.7 Efectos directo sobre los patógenos

Bacillus subtilis es una bacteria que produce hormonas, enzimas y productos volátiles para el control de patógenos (Ryu, *et al*, 2004; Ryu, *et al*, 2014). Hasta el momento se han identificado algunos compuestos que produce este microorganismo y que tienen un efecto directo sobre otros. Esto se ha podido determinar por pruebas *in vitro*, empleando metodologías como cultivos duales, doble capa de agar y antagonismo en medio líquido, entre otros (Cesa, *et al*, 2020). En investigaciones recientes se determinó que después, de la aplicación de esta bacteria algunos nematodos, quedan paralizados por acción de sustancias inhibitorias y en plantas después de ser inoculadas con la bacteria los síntomas causados por virus eran más leves (Wong, *et al*, 2016). Estudios reportan el efecto de las enzimas líticas, producidas por *B. subtilis* SL13, como las quitinasas controlan patógenos como *Rhizoctonia solani* (Yan, *et al*, 2011).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) por ejemplo, *Bacillus subtilis* producen sideróforos que son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, que secuestran elementos como el Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn) en suelos con bajos niveles de estos elementos que son esenciales para el metabolismo microbiano (Bent, 2006). Algunas plantas tienen la capacidad de aprovechar estos metabolitos incrementando la asimilación de estos elementos por parte de las raíces (Aguado, *et al*, 2012). Diferentes aislamientos inducen a la resistencia sistémica inducida en plantas (SIR), al activar especies de oxígeno radioactivo que son, productos tóxicos para agentes patógenos, es producido por las plantas (Villarreal, *et al*, 2017).

1.3.8 Resistencia inducida en plantas (SIR)

“*Bacillus subtilis* activa los mecanismos de defensas en las plantas después del ataque contra patógenos e insectos, produciendo cambios en las plantas como alteraciones citoquímicas y cambios estructurales” (Wang, *et al.*, 2018b). Como describe Pieterse, *et al*, (2014), estos estímulos son percibidos por receptores como PRRs (pattern recognition receptors) y NB-LRRs (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) que se encuentran en todas las células vegetales. Los productos que son reconocidos por la planta son, por ejemplo, la quitina en los hongos y en las bacterias las proteínas como la flagelinas que se conocen como PAMPs o MAMPs, (pathogen o microbe associated molecular patterns), y desencadena una reacción en cadena de defensa en las plantas (Villarreal, *et al*, 2017).

Una ruta conocida que pueden desencadenar respuesta de defensa este biocontrolador es activada por las proteínas efectoras de los patógenos, percibida por receptores como NB-LRRs en las plantas (Boller & Felix, 2009). Esto genera una cascada de reacciones se da por la traducción de señales dependiente de la ruta del ácido jasmónico (JA), del etileno, o

por la ruta del ácido salicílico, que conduce a una respuesta por parte de la planta en el punto de infección. Un estudio reciente que demostró la activación de resistencia con esta bacteria fue al evaluar las aplicaciones de la cepa UMAF6616 de *B. subtilis* que indujo a la resistencia al mildéu polvoso (*Erysiphe cichoracearum* D.C.) en el cultivo de melón, activando la ruta del ácido jasmónico y ácido salicílico, desencadenando una respuesta de defensa en las plantas (García, *et al*, 2013).

Con respecto a lo anterior, estudios han demostrado que esta bacteria induce resistencia a patógenos, lo que se ve reflejado en una menor expresión en la severidad de los síntomas causado por virus, hongos, nematodos, bacterias y micoplasmas (Cesa *et al*, 2020). En cuanto a los cambios que produce *B. subtilis* en el interior de las plantas están: un mayor grosor de la pared celular, incremento en los depósitos de calosa, lignificación de los tejidos, y la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) como; la quitinasa, glucanasas y en la síntesis de fitoaléxinas (Wang, *et al*, 2018b). (En la Tabla 5 se mencionan algunos ejemplos de *B. subtilis* como inductor de resistencia contra patógenos).

Tabla 5. *Bacillus subtilis* como inductor de resistencia contra patógenos.

Microorganismo	Efecto o cambio	Patógeno	Referencia
<i>B. subtilis</i> AUBS1	Activación de proteínas PR (PAL y POD).	<i>Rhizoctonia solani</i> en arroz	Jayaraj, <i>et al</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> OTPB1	Activación de enzimas de defensa (POD, PPO, SOD) y hormonas	<i>Phytophthora infestans</i> en tomate	Chowdappa, <i>et al</i> , 2013
<i>B. subtilis</i> AR12	Activación de enzimas de defensa (PAL, POD, PPO, SOD)	<i>Ralstonia solanacearum</i> en tomate	Li , <i>et al</i> , 2008
<i>B. subtilis</i> Sb4-23	Inhibidor de de enzimas producidas por patógenos	Hongos y nematodos en tomate	Adam , Heuer, & Hallmann, 2014
<i>B. subtilis</i> AF-1	Incremento en la producción de lipoxigenasa e hidropéroxidos	<i>Aspergillus niger</i> , en maní	Sailaja, Podile, & Reddanna, 1997

Abreviaturas PAL: fenilalaninaamoniaco liasa, POD: peroxidasa, PPO: polifenol oxidasa, SOD: superóxido dismutas

1.3.9 Control de *Monilinia fructicola* (Wint) Honey con *Bacillus subtilis*.

Es la primera bacteria reportada como controlador biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (Wint) Honey, en frutos de duraznero (Wilson, & Wisniewski, 1989). Se han identificado numerosos antibióticos y lipopéptidos como: fengicina, iturina y surfactina que produce esta bacteria para el control de este patógeno (Ongena, *et al*, 2005). Trabajos hechos por Yáñez, *et al*, (2012) con la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis*, demostró una fuerte actividad antifúngica contra dos aislamientos de *M. Laxa* y *M. fructicola*. Dentro de los compuestos los más importantes para el control de este fitopatógeno, esta los lipopéptidos en especial de la fengimicina (*fenB*) que demostró su efecto en una cepa trasformada genética no poseía el gen encargado de la síntesis de *fenB*, presentó una menor actividad antifúngica contra el patógeno.

Otro de los compuestos que ha desarrollado por esta bacteria para el control de este patógeno son los compuestos orgánicos volátiles. (VOCs). Trabajos hechos por Zhou, *et al*, (2019) con la cepa CF-3 de *B. subtilis* en pruebas *in vitro* e *in vivo* investigó estos compuestos para inhibir el crecimiento de *M. fructicola*. Determinaron que los compuestos como benzotiazol y el CF-3 24Hfb, inhiben la acción de enzimas producidas por el patógeno como las (pectinasa y celulasa), lo que evitó la descomposición de los tejidos y el daño celular e indujo la síntesis de enzimas como la fenilalanina amoniaco-liasa, quitinasas y la β -1,3-glucanasa en los frutos inoculados, controlando el crecimiento del patógeno y generando resistencia al mismo.

Trabajos hechos por Xue, *et al*, (2019), evaluaron la aplicación de *B. methylotrophicus* en el control de *M. fructicola* en pruebas *in vitro*. Demostró que esta bacteria inhibe en un 81% el crecimiento de este fitopatógeno en pruebas *in vitro*. En pruebas hechas en brotes y frutos, se controló la enfermedad en un 64.3%, los conidios y micelio de *M. fructicola*,

presentaban una forma anormal. En observaciones hechas en el microscopio electrónico se observó que las paredes celulares del fitopatógeno eran más delgadas casi transparentes y las vacuolas estaban deformadas, por ello se recomendó su uso para el biocontrol de esta enfermedad.

Capítulo 2. Control biológico de pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (G. Winter) Honey), con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Microorganismos

Para este estudio se utilizó el aislamiento (JEDO-107) de *Monilinia fructicola*, se aisló de frutos de duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch) de la variedad Dorado del municipio en el Jenesano (Boyacá-Colombia). Se seleccionó por su alta patogenicidad >80% en frutos de duraznero en las variedades (Rubidux, Dorado y Rey negro) (Guarín, *et al*, 2019). El aislamiento de *M. fructicola*, se cultivó en agar papa dextrosa agar (200 g de papa, 20 g de dextrosa, 17 g de agar-agar, 1 lt de agua destilada H₂O y 0.05g de cloranfenicol), durante 15 días a una temperatura de 25°C.

Dos aislamientos de *Bacillus subtilis* (CB10, CB11), se evaluaron para el control de este fitopatógeno. El método utilizado para su aislamiento fue por dilución seriada (10^{-2} g/mL, 10^{-3} g/mL, 10^{-4} g/mL, 10^{-5} g/mL y 10^{-6} g/mL (Yuan, *et al*, 2019). Las bacterias se aislaron de 10 g de suelo rizosférico de un cultivo de duraznero, variedad Rubidux del municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). La muestra que se colectó a una distancia de 20 cm del tallo y 30 cm de profundidad tomando 10 gr de suelo. Las bacterias se seleccionaron por su eficacia en estudios preliminares en el control de la pudrición parda (*M. fructicola*), y de otros patógenos en pruebas *in vitro*. Las bacterias se purificaron en medio de cultivo agar nutritivo glucosa (5.0 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 2.5 g de glucosa, 20 g de agar-

agar, en 1 lt de agua destilada), se dejó en incubación durante 4 días a una temperatura de 28°C.

2.2.2 Identificación de los microorganismos

En trabajos hechos por Guarín, *et al*, (2019), identificó el aislamiento (JEDO-107) por pruebas morfológicas y moleculares. Características morfológicas como: el color, forma y tipo de micelio, y en observaciones hechas en el microscopio determinó, la forma y el ángulo de apertura de los ramoconidios, se clasificó según la clave de Barnett, (1960) p. 46-47 y Agrios, (2005) p. 510 como *Monilinia fructicola*. Para confirmar su identidad los investigadores realizaron pruebas moleculares, se amplificó región del DNA fúngico con los iniciadores ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) e ITS5 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3´), con la secuencia alineada BLAST se buscó su semejanza con bases de datos del genbank del NCBI confirmó la especie a la que corresponde antes dicho.

Para los dos aislamientos de *Bacillus* (CB10, CB11), se identificaron por pruebas morfológicas, bioquímicas recomendadas por el método común sistematizado para identificar bioquímicamente de las bacterias (MacFaddin, 2003 p. 34-56; Lippincott & Wilkins, 2006 p. 19-24; Botero, *et al*, 2013 p. 201-207). Algunas características que se realizó en este estudio, fue la descripción de las colonias, como la forma, color, elevación, en observaciones hechas en el microcopío se determinó la tinción de gram y la presencia de endosporas, junto con la identificación por pruebas bioquímicas.

2.2.3 Actividad antifúngica *in vitro*

Para determinar la actividad antifúngica *k B. subtilis* contra *M. fructicola*, se utilizó un el protocolo descrito por Benitez *et al.*, (2007), con modificaciones en pruebas in vitro. Se

inicio con cajas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA), (papa 4 g L⁻¹, glucosa 20 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹, agua destilada estéril 1 L) (pH = 7.4), a los que se les transfirió discos de micelio de *M. fructicola* ($d = 5$ mm y $p = 5$ mm), con ayuda de un sacabocado esterilizado. Con anterioridad se preparó un caldo nutritivo líquido (pluripeptona 5 g L⁻¹, extracto de Carne 3 g L⁻¹, agua destilada estéril 1 L), para cada aislamiento de *B. subtilis* se ajustó a una concentración de (1 x 10⁻⁹ CFU/mL). Con cada aislado se sembró en el medio con en forma lineal a un 1 cm del borde de la caja. Por último, las cajas petri se dejaron en incubación a 25°C en total oscuridad durante 10 días.

Para medir la actividad de antagonismo se comparó el crecimiento con el del control, donde estaba presente solo el patógeno. Cada día se midió el diametro del crecimiento del micelio y zonas de inhibición del patógeno durante siete días. El porcentaje de inhibición se determinó utilizando la ecuación propuesta por Badía *et al.*, (2011) descrita más adelante. El diseño experimental fue totalmente al azar con cuatro repeticiones. (En la Tabla 6 se muestran los tratamientos evaluados en este experimento).

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) * 100$$

D.C.C: Diámetro de la colonia control (cm). **D.C.P:** Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas en cm).

Tabla 6. Distribución de los tratamientos, en prueba in vitro de *B. subtilis* vs *M. fructicola*

Tratamiento	Sigla	Descripción
1	T1 C1	Inoculación de la aislamiento CB10 de <i>B. subtilis</i> con <i>M. fructicola</i> en PDA
2	T1 C2	Inoculación de la aislamiento CB11 de <i>B. subtilis</i> con <i>M. fructicola</i> en PDA
3	C1	Aislamiento CB10 de <i>B. subtilis</i> cultivado en PDA
4	C2	Aislamiento CB11 de <i>B. subtilis</i> cultivado en PDA
5	T1	Cepa (JEDO-107) de <i>M. fructicola</i> cultivado en PDA

2.2.4 Material vegetal

Frutos de duraznero sanos y libres de enfermedades y plagas de la variedad Dorado fueron esterilizados superficialmente para eliminar agentes infecciosos, con agua jabonosa e hipoclorito de sodio a una concentración del 2.5%, luego se lavaron por triplicado con agua destilada esteril y por último, se secaron en la cabina de flujo laminar.

2.2.5 Actividad antifúngica en frutos de duraznero

Para esta evaluación se utilizó un protocolo descrito por Li *et al*, (2015), con anterioridad, se había preparado un medio de cultivo caldo nutritivo de cada aislamiento de *B. subtilis*, (CB10, CB11), durante 3 días a 28°C en un mezclador rotativo (Shaker). Después se preparó una solución a una concentración de (1×10^{-9} CFU/mL). En medio de cultivo PDA, se sembró el aislamiento (JEDO-107) de *M. fructicola* durante 15 días a una temperatura de 25°C.

Los frutos ya desinfectados y secos se colocaron en una suspensión con cada cepa de *B. subtilis* (CB10, CB11) junto con un producto coadyuvante, dispersante y adherente (Inex-A, Cosmoagro), (0.3g/L), su ingrediente activo es (Alquil polietier alcohol etoxilado, alquil poliglicol y Aril polietoxietanol), por espacio de 4 horas. En este experimento también se evaluó un fungicida comercial para el control del patógeno, cuyo ingrediente activo era Dicloram (modo de acción es la inhibición de la síntesis de lípidos y alteración de la membrana celular), usando la dosis recomendada por el fabricante. Como control negativo se incluyó frutos sanos que solo se inocularon con agua destilada estéril. Los tratamientos evaluados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos evaluados en frutos de duraznero para el control de *M. fructicola*

Tratamiento	Sigla	Descripción
1	TB1M	Inoculación con la cepa CB10 de <i>B. subtilis</i> con <i>M. fructicola</i> ,
2	TB2M	Inoculación con la cepa CB11 de <i>B. subtilis</i> con <i>M. fructicola</i>
3	TQM	Aplicación de Dicloram e Inoculación con <i>M. fructicola</i>
4	TM	Inoculación de frutos con <i>M. fructicola</i>
5	TC	Inoculación de frutos con agua destilada estéril (Testigo control)

Con un sacabocados estéril de 0.5 cm de diámetro, se realizaron perforaciones en la zona ecuatorial de los frutos inoculados con las cepas de *Bacillus subtilis*. En cada orificio se depositó un disco de micelio de *M. fructicola* del mismo tamaño, se dejaron en cámaras húmedas en condiciones controladas a una temperatura de 24°C. por espacio de 7 días. El diseño experimental fue totalmente al azar con tres repeticiones. Durante el experimento se registró el porcentaje de severidad, que corresponde al área de tejido afectado por la enfermedad se estableció según la siguiente fórmula y escala de severidad propuesta por Zapata (2002) Figura 6:

$$S (\%) = \frac{\sum (n \times I) + \sum (n \times I)}{N}$$

S (%) = Severidad de la enfermedad expresada en porcentajes del tejido afectado, **n** = Número de unidades de muestreo clasificado en cada clase, **I** = Índice de severidad por cada clase según la escala descrita por Castaño (2002), **N** = Número total de unidades de muestreo observadas

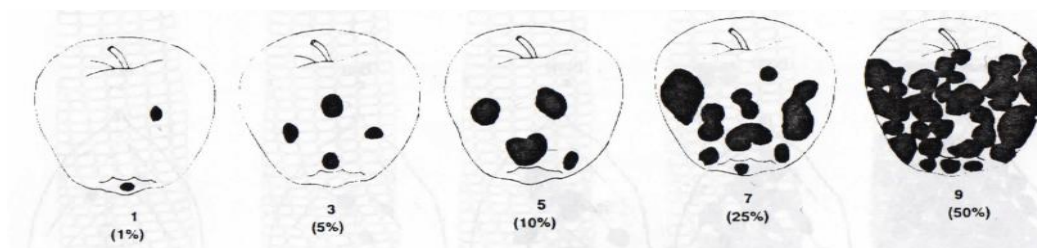


Figura 6. Diagrama de severidad para estimar el daño en frutos causados por Roña del manzano (*Venturia inaequalis*) adaptado para *Monilinia fructicola*. Fuente (Castaño Zapata, 2002, Pág 135-138)

Otro parámetro que se considero fue la tasa de inhibición que evalúa la efectividad en el control de la enfermedad según la fórmula propuesta por Yuan, *et al*, (2019):

$$TI (\%) = \frac{To - Tt}{Tc} \times 100$$

TI (%) = Tasa de inhibición (%), To = Tamaño de la lesión de los frutos sin tratar (cm²) Tt = Tamaño de la lesión de los frutos tratados (cm²), Tc = Tamaño de la lesión en el control

2.2.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron aplicando una prueba de varianza ANOVA, para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó la prueba estadística de LSD, utilizando el paquete estadístico SPSS statistic 11.5 con un porcentaje de significancia del P< 0.05.

2.3 Resultados

Frutos de duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch), de la variedad dorado infectados con la pudrición parda (*M. fructicola*), se colectaron de un cultivo comercial en el municipio de Jansano (Boyacá- Colombia). Los arboles infectados manifestaron tizones en flores y en los frutos se observó una pudrición de forma circular, con una capa densa de micelio de color gris que los cubría rápidamente hasta causar su momificación (pérdida de agua de los tejidos), y su pudrición general, los frutos perdían todo valor comercial y eran fuente de inóculo del patógeno. (En la Figura 7 se muestran los frutos infectados por la pudrición parda causada por *Monilinia fructicola* en un huerto de duraznero).



Figura 7. Frutos de duraznero variedad Dorado infectados por la pudrición parda *M. fructicola*, colectados de un huerto comercial. *Fuente* Patiño 2019.

2.3.1 Identificación morfológica *Monilinia fructicola*

En el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), las colonias de la cepa (JEDO-107), de *Monilinia*, presentó una abundante esporulación, el color del micelio era color gris en el centro era de color amarillo. En el reverso de la caja el micelio era de color café oscuro. La tasa de crecimiento del micelio fue de 8.35 - 9.25 mm/día. En microscopio se observó abundantes ramoconidios muy ramificados, los conidióforos tenían una apertura de 45°, los conidios eran de forma ovalada o globosa y median aproximadamente 12,0-17,5. Según las claves de Barnett, (1960) y Agrios, (2005) Se identificó que la cepa (JEDO-107) corresponde a la especie *Monilinia fructicola*, (En la Figura 8, se muestra el aislamiento de *M. fructicola* en el medio de cultivo papa dextrosa agar y observaciones hecha en el microscopio para la identificación vista en el microscopio a 40x).

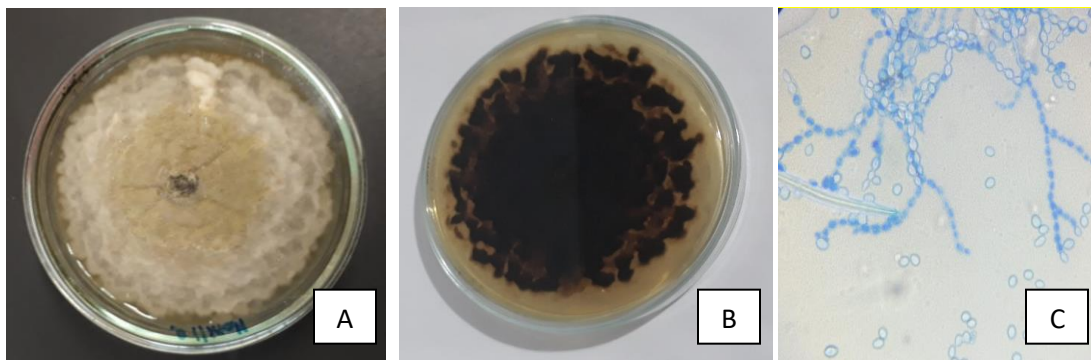


Figura 8. Características morfológicas de *M. fructicola*, cepa (JEDO-107). (A y B) Crecimiento en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. (C) Conidios y conidióforos visto a (40x)

2.3.2 Identificación molecular *Monilinia fructicola*

Según el trabajo hecho por Guarín, *et al*, (2019). Realizaron una búsqueda de la secuencia alineada para el aislamiento (JEDO-107) con el buscador del BLAST de la base de datos del genbank en el NCBI, dio como resultado que la secuencia alineada del DNA fúngico corresponde a la especie *Monilinia fructicola*, el peso molecular fue de 535 pb, después de la visualización en geles de agarosa al 2%. El número de acceso para este aislamiento es KM652455 en el GENBANK.

2.3.3 Identificación *Bacillus* spp.

En laboratorio se identificaron dos aislamientos de *Bacillus* spp (CB10 y CB11. Las colonias eran de color blanco, aspecto mucoide, median aproximadamente de 2,5 a 4 mm de diámetro, su aspecto era liso, los bordes ondulados, su crecimiento era muy rápido en medio de cultivo agar nutriente (A.N). Después de 24 horas se realizó la tinción de gram se identificó como bacilos gram positivos, su forma era bacilar, media cada uno de 1 a 6 μm de largo, con esporas en el centro de las bacterias (En la Figura 9 se muestra las colonias del aislamiento CB10 y CB11 en medio de cultivo agar nutriente y vista de las bacterias en el microscopio 100x).

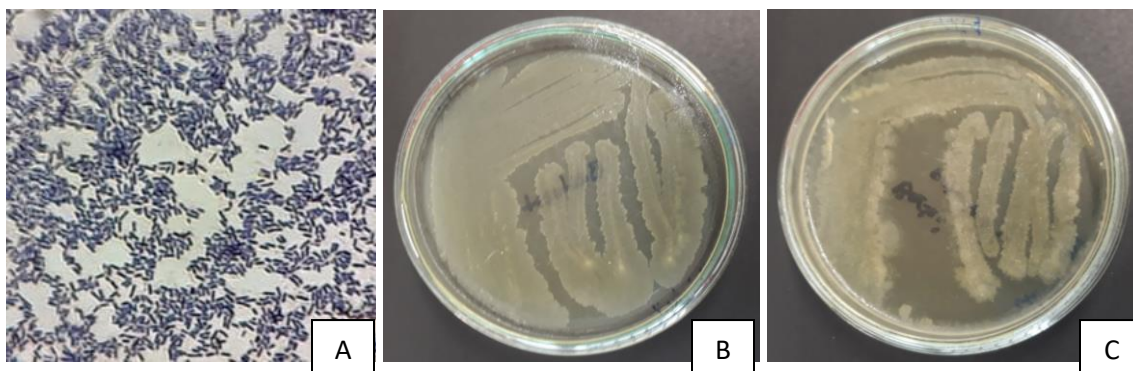


Figura 9. Aislamientos (CB10 y CB11) de *Bacillus subtilis* (A) Bacterias después de la tinción de Gram bacilos gram positivos vistos a 100x para las cepas. (CB10 y CB11). (B) Crecimiento en Agar Nutriente después de 48 horas de la cepa CB10, (C) Crecimiento en Agar Nutriente después de 48 horas de la cepa CB11. Fuente: Autores (2019)

Características bioquímicas

En el laboratorio se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para identificar la especie que correspondía los dos aislamientos de *Bacillus* (CB10 y CB11). Se determinó que eran anaerobios facultativos, presentaban hidrolisis de la gelatina y crecimiento positivo en medio salino al 7%. (En la Tabla 8 y en la figura 10 se muestran los resultados, que las identifica como *Bacillus subtilis*, según MacFaddin, (2003) p. 34-56; Botero, *et al*, (2013) p. 201-207.

Tabla 7. Características diferenciales para la especie *Bacillus subtilis*

Medios de prueba	CB10	CB11
Reacción coloración de Gram	+	+
Reconfirmación del Gram con KOH al 3%	-	-
Presencia de endóspora central	+	+
Crecimiento en caldo nutritivo + NaCl 7%	+	+
Catalasa	+	+
Medio KB	-	-
Licuefacción en gelatina a 22°C	+	+
Medio YDC	-	-
Forma	Bacilar	Bacilar
Respiración	AF	AF
Olor	Fuerte	Leve

Fuente: Autores (2019)

- Según el método descrito por MacFaddin, (2003) p. 34-56, Se realizó la tinción de gram a las 24 horas después de sembrarlos en medios agar nutriente. En observaciones hechas en el microscopio se determinó que los aislamientos CB10 y CB11 eran gram positivos y su forma era bacilar.

-Prueba de KOH 3%, confirmó los resultados de la tinción de Gram, esta prueba fue negativa no se formó un hilo de aspecto mucilaginoso. El KOH destruye las paredes celulares de las bacterias gram negativas, liberando el DNA que es de aspecto viscoso por lo cual, los dos aislamientos se clasifican como Gram positivos por no formar estos hilos.

- Prueba de tolerancia sal, que es la capacidad de las bacterias en crecer en una concentración del 7% de Cloruro de Sodio (NaCl), en el agar nutriente con un indicador de pH púrpura de bromocresol. El resultado fue positivo por el cambio de color de púrpura a amarillo y por la turbidez que se observó en los tubos.

- Prueba de la catalasa, es una prueba que determina la presencia de la enzima catalasa que es la encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El resultado fue positivo por la formación de burbujas,

- Licuefacción de la gelatina, es una prueba que determina la presencia de las enzimas proteolíticas, después de incubar las bacterias durante siete días a 35°C, en medio agar gelatina, los dos aislamientos fueron positivos.

- Crecimiento en medio KB, este es un medio que permite identificar especies de *Pseudomonas fluorescens*, que emiten fluorescencia, en este caso fue negativo.

- Crecimiento en medio YDC, medio que permite identificar el género *Xanthomonas* spp, en este caso, si perteneciera a este género las colonias serían amarillas en este caso fue negativo para los dos aislamientos.

- En medio de cultivo agar nutritivo las colonias eran grandes e irregulares con bordes ondulados, las cepas eran anaerobias facultativas al desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno.

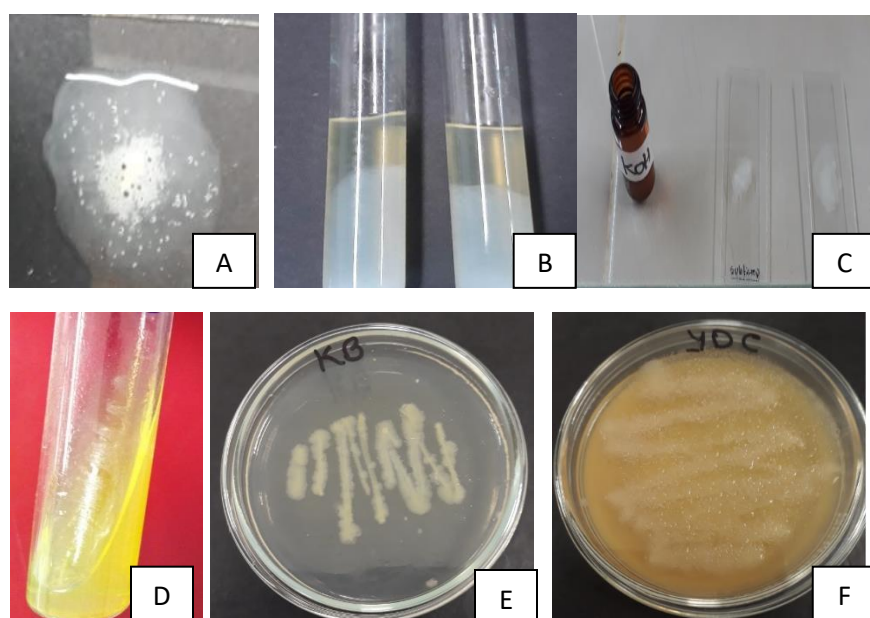


Figura 10. Pruebas bioquímicas de los aislamientos (CB10 y CB11) de *Bacillus subtilis* (A) Prueba catalasa positiva. (B) Prueba de licuefacción de gelatina positiva. (C) Prueba de KOH 3% negativa, (D) crecimiento en agar nutritivo + NaCl 7% positivo, (E) Crecimiento en agar KB, negativo Y, por último (F) Crecimiento en Agar YDC, resultado negativo. Fuente: Autores (2019)

2.3.5 Actividad antifúngica *in vitro*

Este experimento se diseñó para establecer la actividad antifúngica de dos cepas de *Bacillus subtilis* CB10 y CB11 de para el control de *Monilinia fructicola* (JEDO-107). Los resultados mostraron que la cepa CB10, presentó una mayor inhibición en el crecimiento micelial de *M. fructicola* entre un 90%, a diferencia de la cepa CB11 que registró una tasa de inhibición entre un 70 - 60%. (En la Figura 11 se muestra el efecto antifúngico *in vitro*).



Figura 11. Prueba *in vitro* de *Bacillus subtilis* para el control de *Monilinia fructicola* (JEDO-107). A) cepa CB10 de *B. subtilis* x *M. fructicola*, B) cepa CB11 *B. subtilis* x *M. fructicola*, C) Ceba CB10 de *B. subtilis*, D) Ceba CB11 de *B. subtilis*. Fuente: Autores (2019)

Junto con el crecimiento micelial se determinó el halo de inhibición para evaluar el biocontrol de las dos cepas de *Bacillus subtilis* contra *M. fructicola*. Los resultados mostraron que la cepa CB10 presentó un halo de inhibición de 14 mm, superior que la cepa CB11 con diferencias altamente estadísticas. En cultivos duales con cepa CB10 y fitopatógeno, se observó una mayor disminución en el crecimiento y esporulación de *M. fructicola*. Para la cepa CB11 el tamaño del halo fue menor de solo 7,5 mm. Por tanto, se observa que hay una diferencia en el crecimiento de los halos de inhibición esto se debe a ciertos productos desarrollados por las cepas bacterias evitan el crecimiento del fitopatógeno y por la competencia por espacio (En la Tabla 8 se muestra los resultados de la tasa y halo de inhibición de dos cepas de *B. subtilis* contra *M. fructicola*)

Tabla 8. Tasa y halo de inhibición de dos cepas de *B. subtilis* contra *M. fructicola*

Tratamientos	Tasa de inhibición (%)	Tamaño halo de inhibición (mm)
<i>M. fructicola</i> x <i>B. subtilis</i> CB10	88,5 + 1,73	14 + 1,1,41 b
<i>M. fructicola</i> x <i>B. subtilis</i> CB11	70 + 1,41	7,5 + 1,29 a

*Significado Letras de diferentes presenta diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de LSD $P < 0,05$

Otro parámetro que se determinó fue el crecimiento individual de las dos cepas de *Bacillus subtilis* (CB10 y CB11) y del aislamiento de *Monilinia frutícola* (JEDO-107), en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Según los resultados, la tasa de crecimiento fue mayor en la cepa CB10 de aproximadamente 35 mm/día, lo que le permite ocupar más rápido espacio, lo que es una ventaja en el control por espacio. La cepa CB11 registró un crecimiento promedio de 25 mm/día. Para el caso del fitopatógeno el crecimiento en el medio de cultivo fue menor en promedio 10 mm/día, con diferencias altamente estadísticas con otros tratamientos. De acuerdo a lo anterior, esto daría una ventaja en el biocontrol de *B. subtilis* contra este fitopatógeno, cabe resaltar que hay un mejor control se estableció con el aislamiento CB10 de *B. subtilis*. (Los resultados del crecimiento individual de los microorganismos se muestran en la Figura 12).

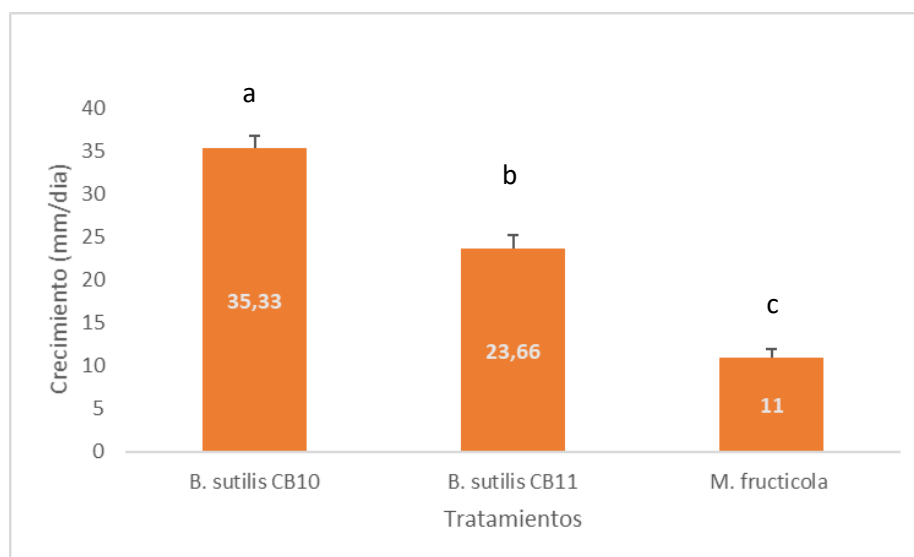


Figura 12. Tasa de crecimiento del aislamiento (JEDO-107) de *Monilinia frutícola* y de las cepas CB10 y CB11 de *Bacillus subtilis*. *Significado. Letras de diferentes presenta diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de *LSD* $P < 0,05$

2.3.6 Actividad antifúngica en frutos de durazno

Frutos duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch) de la variedad dorado, desinfectados se inocularon con dos cepas de *B. subtilis*, (CB10 y CB11) y un fungicida (Dicloram). Un control negativo con agua destilada estéril. Luego, fueron inoculados con el fitopatógeno (*M. frutícola*), menos el tratamiento control. Los frutos se les perforaron con un sacabocados en la zona ecuatorial, donde y se depositaron discos de micelio del patógeno de 5 mm, se dejaron en incubación (En la Figura 13, se muestra el proceso de inoculación en frutos de duraznero).

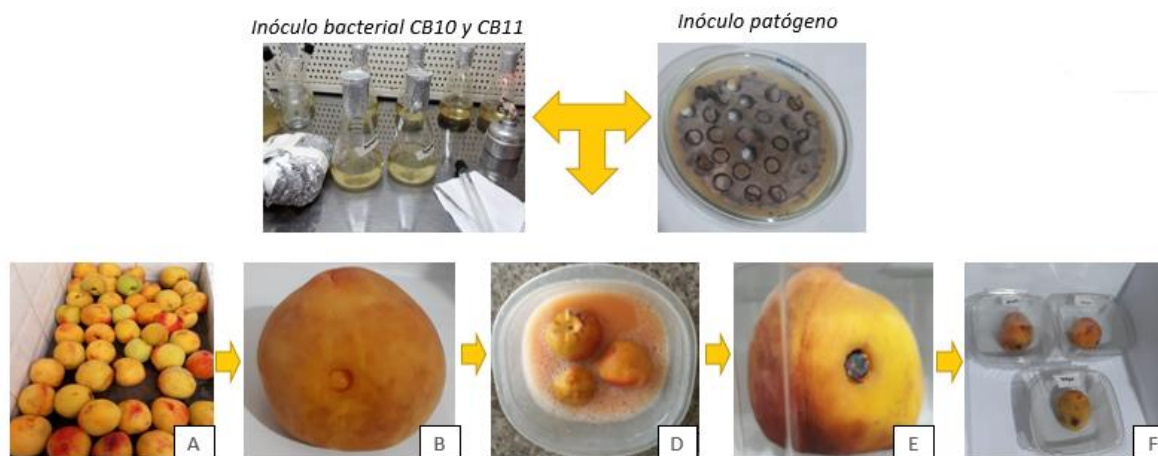


Figura 13. Método de inoculación de *Monilinia fruticola* en frutos de duraznero. A) Aislamiento de *Monilinia fruticola* en medio PDA. B) Frutos de duraznero variedad Dorado, C) Fruto desinfectado con una perforación. D) Inoculación con las cepas bacterianas E) Fruto inoculado con el aislamiento de *Monilinia fruticola* F) Montaje de cámaras húmedas. Fuente: Autores (2019)

Después de la inoculación con *M. fruticola* (JEDO-107) en frutos de duraznero, inoculados con las dos cepas de *B. subtilis*, (CB10 y CB11) y con un fungicida comercial (Dicloram), se pudo determinar una disminución en el crecimiento y esporulación del patógeno, comparadas con los frutos inoculados con el patógeno. La concentración evaluada 1×10^9 UFC/mL *B. subtilis*, aunque un muy alta permitió un control del patógeno,

registrándose un mejor efecto antifúngico y antiesporulante con el aislamiento CB10 de *B. subtilis*. Hay que resaltar, que esta cepa registró un mejor control que la cepa CB11, este último, mostró un comportamiento similar con el fungicida (Dicloram) en el control del patógeno. Los resultados demuestran que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* cepa CB10 ofrecen un mejor control de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) en frutos de duraznero, a diferencia de los otros tratamientos (En la Figura 14 se muestran los resultados del efecto antifúngico de dos cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11), y un fungicida (Dicloram) contra *M. frutícola* en frutos de duraznero).

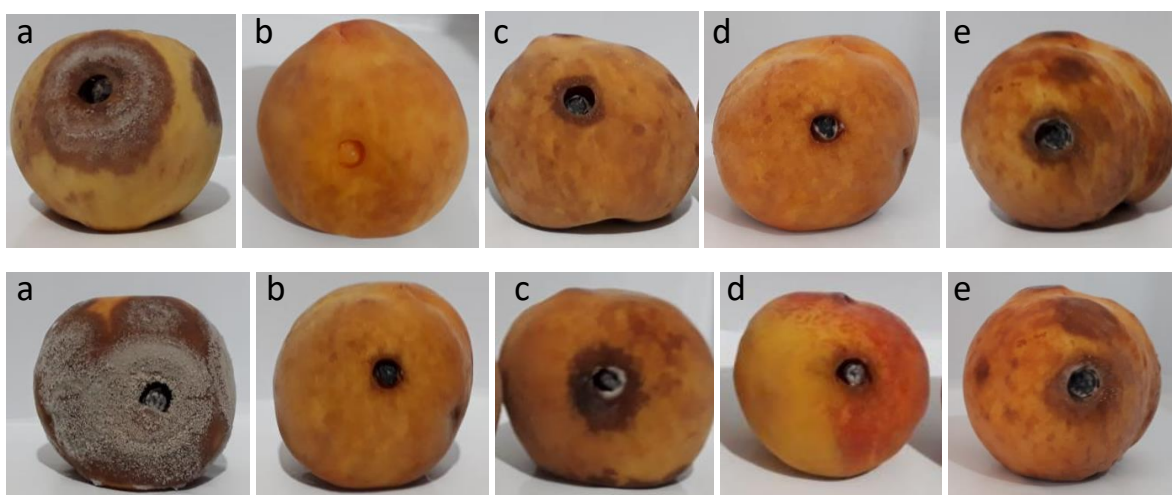


Figura 14. Efecto antifúngico de cepas de dos aislamientos de *B. subtilis* (CB10 y CB11), y un fungicida (Dicloram) contra *M. frutícola* aislamiento (JEDO-107) en frutos de duraznero a los 3 y 6 días. A) Frutos inoculados con *M. fructicola* B) Frutos inoculados con agua destilada estéril. C) Frutos inoculados con la cepa CB11 de *B. subtilis* y *M. fructicola*. D) Frutos inoculados con la cepa CB10 de *B. subtilis* y *M. fructicola*. E) Frutos asperjados con Dicloram y *M. fructicola*. Fuente: Autores (2019)

2.2.7 Severidad

Durante 7 días se determinó la severidad que corresponde al porcentaje de tejido afectado por el patógeno para cada tratamiento. Los resultados mostraron que los frutos inoculados con *M. frutícola*, la enfermedad se desarrolló muy rápido afectado en más del

60% de la superficie de los frutos en menos de seis días. En los frutos tratados con el fungicida Dicloram la enfermedad afectó solo un 35%, registrando un resultado similar con el tratamiento con la cepa CB11 de *B. subtilis*. El tratamiento con la cepa CB10 de *B. subtilis*, se registró el menor porcentaje de severidad solo un 10%, considerándose una medida eficaz para el control de esta enfermedad, en comparación con otros tratamientos. (En la Figura 15 se muestran estos resultados de severidad en los tratamientos evaluados).

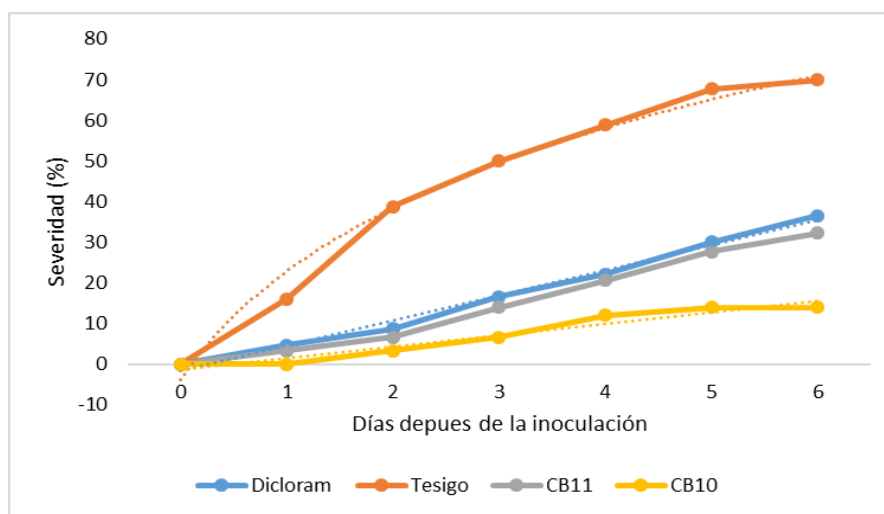


Figura 15. Porcentaje de severidad de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (JEDO-107) en frutos de duraznero, inoculados con dos cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11) y un fungicida (Dicloram). Fuente: Autores (2019)

Tasa de inhibición

Para determinar el control dos cepas de *B. subtilis* y un fungicida contra la pudrición morena (*Monilinia fructicola*), se evaluó la tasa de inhibición que corresponde al efecto en el control sobre el fitopatógeno. Los resultados mostraron que el tratamiento que corresponde a la cepa CB10 fue el más efectivo, registrando un menor radio de crecimiento promedio 0,53 mm día, y una mayor tasa de inhibición > 95%, lo que significa en un mayor control a diferencia de otros los tratamientos, con diferencias altamente estadísticas.

Los resultados muestran que existe un efecto antiesporulante y antifúngico que produce *Bacillus subtilis* en especial la cepa (CB10). Para los tratamientos del control químico (Dicloram) y con la cepa CB11 de *B. subtilis*, la tasa de inhibición fue muy similar entre un 70%, sin diferencias estadísticas entre ellos. Para el control los frutos inoculados con el patógeno, registró el mayor crecimiento promedio de 4,53 mm/día, con una abundante esporulación de color gris que afectaba muy rápido los frutos (En la Tabla 10 se muestran los resultados de la tasa de inhibición y crecimiento promedio de *M. fructicola*, para los tratamientos evaluados).

Tabla 9. Tasa de inhibición y promedio de radio de la lesión causada por *M. fructicola* en frutos de duraznero tratados con dos cepas de *B. subtilis* (CB10 y CB11) y un fungicida

Tratamientos	Tasa de inhibición (%)	Promedio radio de la lesión (mm)
<i>M. fructicola</i>	-	4,53 ± 21,16 a
Dicloram	70,33 ± 14,43 a	2,32 ± 20,13 b
<i>B. subtilis</i> (CB11)	71,33 ± 13,65 a	2,46 ± 4,61 b
<i>B. subtilis</i> (CB10)	95,83 ± 7,21 b	0,53 ± 5,77 c

*Significado Letras de diferentes presenta diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de LSD P < 0,05

2. 4 Discusión

La pudrición parda (*Monilinia fructicola*), es considerada la enfermedad más limitante en el cultivo de duraznero en todo el mundo (Mallvárez, *et al*, 2001; Muñoz, Moret, & Bech, 2008; Salgado, 2011). Cabe resaltar que existen diferentes especies de *Monilinia* spp. que afecta el cultivo de duraznero, pero en Boyacá Colombia la especie más destructiva es *M. fructicola*, afecta flores, ramas y frutos, causando grandes pérdidas en campo y poscosecha (Guarín, *et al*, 2019).

En la actualidad, existe un gran interés por el consumo de productos orgánicos, por lo que se han desarrollado estudios para el manejo de enfermedades con productos inócuos al entorno como los controladores biológicos. Los biofungicidas o (biocontroladores) son una alternativa sostenible en el manejo enfermedades en cultivos de interés. Bajo ese contexto, cabe resaltar a *Bacillus subtilis* es el principal ingrediente activo de numerosos bioinoculantes y biofungicidas que se encuentran en el mercado en Colombia. Dentro de las ventajas que ofrece está en el considerarse un producto seguros, ecológicos y sostenibles, con una menor tasa de degradación, efectivo en pequeñas dosis y compatibles con fertilizantes y la población de microorganismos nativos (microbioma) (Posada, Villegas, & Romero, 2017).

En estudios recientes ha demostrado que *B. subtilis* efectivo en el control de *Monilinia* en otros países como China, (Xue, *et al*, 2019) y en España (Yáñez, *et al*, 2012), por mecanismos que afectan directamente al fitopatógeno, como por ejemplo por la producción lipopéptidos como: la fengicina, iturinas, surfactinas, en frutos y flores y, por mecanismos indirectos como la inducción de la resistencia sistémica adquirida en frutos y la inhibición de las enzimas producidas por el patógeno (Zhu, *et al*, 2011). Como una nueva alternativa en el control de la pudrición parda, se puede utilizar a *Bacillus subtilis*, para disminuir los porcentajes de daño y contagio en campo y en poscosecha, dando un valor agregado con cultivos orgánicos y limpios y así reduciendo la contaminación al ecosistema y mejorando la resistencia a otros patógenos.

El control biológico de enfermedades ha sido un nuevo enfoque para el manejo de las principales enfermedades en cultivos de interés. En estos últimos años, se ha estudiado el efecto de las aplicaciones de cepas de *Bacillus* en la filósfera y rizósfera de las plantas, en

donde se ha podido constatar la asociación de estas con las raíces y hojas, comportándose como simbioses al producir biopelículas que cubren toda la superficie evitando la invasión de los agentes patógenos (Rudrappa *et al.* 2008).

Trabajos recientes, determinaron que algunas cepas de *Bacillus* spp. han desarrollado algunos mecanismos de antagonismo microbiano, que conducen a las plantas a producir una resistencia sistémica inducida (SIR) (Akinrinlola, *et al.*, 2018). Uno de los productos que han desarrollado para el control de fitopatógenos son los antibióticos que inhiben el crecimiento de otros organismos y elementos quelantes del hierro (Fe^{+2}), que es un elemento que requiere los microorganismos para su crecimiento y desarrollo (Agrios, 2005, p.509).

Un ejemplo de un control biológico para la pudrición parda lo desarrolló Yáñez *et al.*, (2012), quienes evaluaron el control biológico de la cepa CPA-8 de *B. subtilis* contra aislamientos de *Monilinia laxa* y *M. fructicola*. Los resultados demostraron que esta bacteria inhibe el crecimiento de *M. laxa* y *M. fructicola*, reduciendo las infecciones causadas por estos dos patógenos. Esto se debe a la producción de lipopéptidos como las surfactinas, bacilomicinas D, iturina A, y fengimicina esta última, solo se activa para el control de *M. fructicola*.

Algunos productos antes mencionados son los responsables a la respuesta antimicrobiana, de *B. subtilis* en especial los lipopéptidos, que producen diferentes especies del género *Bacillus*, este compuesto es el responsable reducir la severidad causadas por diferentes microorganismos algunos ejemplos son: la cepa WXCD105 de *B. subtilis* contra *Botrytis cinerea* y *Cladosporium fulvum* en el cultivo de tomate (Wang *et al.*, 2018a). Algunas cepas de *B. subtilis* son biocontroladoras de patógenos foliares como en Sigatoka

(*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo del plátano (Ceballos *et al.*, 2012). Otros compuestos antimicrobiales que producen la mayoría de especies de *B. subtilis* son los lipopéptidos (Mosquera *et al.*, 2014). Estos son los responsables en desarrollar un incremento en la resistencia a patógenos como: *Colletotrichum acutatum* en tomate de árbol y en *Botrytis cinérea* en el cultivo del crisantemo (Mosquera *et al.*, 2014).

Una gran cantidad de antibióticos juega un rol muy importante en el control de fitopatógenos, existe una evidencia directa se ha demostrado en pruebas *in vitro*, en donde se observa que la aplicación de filtrados de medios de cultivo con esta bacteria inhibe o frenan el crecimiento de hongos patógenos. Estos productos juegan un rol muy importante dentro de los mecanismos de biocontrol de esta bacteria (Patiño, *et al.*, 2012, p. 179-187; Mosquera *et al.*, 2014).

En este trabajo se realizaron pruebas de laboratorio para dos bacterias aisladas del suelo de un cultivo de duraznero, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas y morfológicas que permitieron su identificación, para dos aislamientos CB10 y CB11, que se identificaron como *Bacillus subtilis*. Hay que destacar que los aislamientos ejercieron un control en el crecimiento en medios de cultivo duales y en frutos de duraznero inoculados con el patógeno.

Según, los resultados en pruebas *in vitro* con y en frutos inoculados fueron muy similares, registrando casi los mismos valores. La cepa CB10 de *B. subtilis* ejerció un mejor control contra el patógeno. Este estudio pudo establecer que existen compuestos antimicrobianos, que desarrolla *B. subtilis* contra la pudrición parda que frenan su crecimiento, pero esto se ve favorecido con una concentración de 1×10^{-9} CFU/mL.

Se demostró que la cepa CB10 de *B. subtilis*, puede utilizarse en el biocontrol de *M. fructicola* por qué; las aplicaciones inhibieron el crecimiento y esporulación del patógeno tanto en pruebas *in vitro* como en frutos inoculados. Hay que resaltar que esta bacteria desarrolla múltiples compuestos antimicrobianos que limitan el crecimiento y debilita la pared celular del patógeno, restringiendo su crecimiento con efectos antifúngicos y antiesporulantes contra este patógeno. Este estudio provee información necesaria para implementar controles utilizando este biocontrolador, de enfermedades en caducifolios y así reducir las infecciones en campo y en poscosecha.

3. Conclusiones y Recomendaciones

3.1 Conclusiones

- La pudrición parda causada por *Monilinia frutícola*, es la enfermedad más limitante en el cultivo de duraznero a nivel mundial, afecta tanto a flores, ramas y frutos y registra cuantiosas pérdidas en las cosechas (Agrios, 2005). En Colombia las epidemias causadas por este patógeno son muy recurrentes y devastadoras, hasta el momento no hay resistencia genética a la enfermedad y el control se realiza únicamente con la aplicación de compuestos químicos y prácticas culturales.

- Estudios han demostrado diferentes mecanismos de *Bacillus subtilis* en el control de agentes infecciosos en plantas, dentro de los que se destacan los lipopeptidos, antibióticos, entre otros, que reducen la incidencia y severidad de las enfermedades en las plantas (Lui, *et al*, 2011).

- En poscosecha y en pruebas *in vitro* se ha demostrado, la inhibición en el crecimiento y desarrollo de fitopatógenos de *Bacillus subtilis*, por la producción de compuestos antimicrobianos desarrollados para el control de la pudrición parda causada por *Monilinia fruticola* (Yáñez, *et al*, 2012).

- En pruebas en laboratorio se identificó dos aislamientos bacterianos como *Bacillus subtilis*, según las pruebas bioquímicas como morfológicas, utilizando claves específicas.

- En este estudio se reconoció una diferencia en la intensidad del olor entre las cepas biocontroladoras (CB10 y CB11), siendo más fuerte en la cepa que registró un mayor antagonismo frente al patógeno.

-En este estudio se demostró que la cepa CB10 de *B. subtilis*, inhibe el crecimiento y esporulación aislamiento (JEDO-107) de *M. frutícola*, a diferencia de otros tratamientos tanto en pruebas *in vitro* como en pruebas en frutos de duraznero inoculados con el patógeno.

3.2 Recomendaciones

- Los resultados demuestran la habilidad que tiene la cepa CB10 de *Bacillus subtilis* en el control de fitopatógenos como *Monilinia. fruticola*, sería recomendable realizar pruebas en campo para evaluar el efecto inhibitorio de este patógeno, manejando una concentración de 1×10^{-9} CFU/mL y un coadyudante.

- Se recomienda realizar una identificación de los compuestos que produce las bacterias por estudios por HPLC y evaluar su efecto *in vitro* y en campo y así utilizarlo en el biocontrol de otros patógenos.

- Sería importante evaluar la interacción de *B. subtilis* con otras cepas bacterianas, para emplearlos como biofungicidas o bioinoculantes en diferentes cultivos y en caducifolios.

4. Anexos

Resumen Estadístico para tamaño del halo de inhibición en pruebas in vitro

A.Col_1	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
CB10	4	90,25	1,25831	1,39424%	89,0	92,0	3,0
CB11	4	67,25	2,62996	3,91071%	65,0	70,0	5,0
Total	8	78,75	12,4413	15,7985%	65,0	92,0	27,0

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1058,0	1	1058,0	248,94	0,0000
Intra grupos	25,5	6	4,25		
Total (Corr.)	1083,5	7			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de CB10 en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 248,941, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media, con un nivel del 95,0% de confianza.

Resumen Estadístico para Tasa de crecimiento del aislamiento (JEDO-107) de *Monilinia fruticola* y de las cepas CB10 y CB11 de *Bacillus subtilis*.

A.Col_1	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
CB11	3	35,3333	1,52753	4,32318%	34,0	37,0	3,0
CB10	3	23,6667	1,52753	6,45433%	22,0	25,0	3,0
M.F	3	11,0	1,0	9,09091%	10,0	12,0	2,0
Total	9	23,3333	10,6066	45,4569%	10,0	37,0	27,0

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	888,667	2	444,333	235,24	0,0000
Intra grupos	11,3333	6	1,88889		
Total (Corr.)	900,0	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Col_2 en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 235,235, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media, con un nivel del 95,0% de confianza.

Resumen Estadístico. Promedio radio de la lesión (mm)

<i>Col_1</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coeficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
1	3	70,3333	14,4338	20,5219%	62,0	87,0	25,0
2	3	71,3333	13,6504	19,1361%	62,0	87,0	25,0
3	3	95,8333	7,21688	7,53066%	87,5	100,0	12,5
Total	9	79,1667	16,3745	20,6836%	62,0	100,0	38,0

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	27,8466	3	9,28219	408,91	0,0000
Intra grupos	0,1816	8	0,0227		
Total (Corr.)	28,0282	11			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Col_2 en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 408,907, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Bibliografía

- Abarca R, P., Allende C., M., Antúnez B, A., Hirzel C, J., Carrasco J., J., Felmer E, S., Sepúlveda R., P. (13 de octubre de 2017). *Manual de manejo del cultivo de duraznero* (Vol. BOLETÍN INIA / N° 08). (P. Abarca R., Ed.) Santiago de Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Pág.97-101
- Adam, M., Heuer, H., & Hallmann, J. (2014). Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLOS ONE*, 9:90402.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology fifth edition. Department of Plant Pathology* (5 th ed.). Florida: Elsevier Academic Press. Pág 181-182, 235,251, 507-510
- AGRONET. (12 de septiembre de 2019). *Área, producción y rendimiento del cultivo del durazno en Colombia (2007-2018)*. Obtenido de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Aguado S., G., Moreno G, B., Jiménez, F., García M., E., & Preciado O, R. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35:9-21.
- Ahmed S. A., E., Syed, I., Wen, Q., Abdulwareth A, A., Wang, L., Zhang, Y., Guo-Chang, S. (2016). Controlling and Defence-related Mechanisms of *Bacillus* Strains against Bacterial Leaf Blight of Rice. *Journal of phytopathology*, 534–546.
- Akinrinlola, R J.; Yuen, G Y.; Drijber, R A.; and Adesemoye, A. O., (2018). "Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by *In Vitro* Physiological Traits" *Papers in Plant Pathology*. 595. <https://digitalcommons.unl.edu/plantpathpapers/595>
- Akram, W., Mahboob, A., & Javed, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3:275–280.
- Arellano, O., & Rendón, O. (1 de octubre de 2019). *La huella de los plaguicidas en México. E. Martínez. Greenpeace México A. C. Las Flores 35 Col. Pueblo de Los Reyes, C.P. 04330 Coyoacán, México. 39 p.*
- Arkhipova, T., Veselov, S. U., S., & Melentiev, A. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce Cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*, 272, 201–209.

- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied. Environmental. Microbiology*. 62, 4081-4085. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/7244033>
- Balakrishnan S, Indira K, Srinivasan M. (2015) Mosquitocidal properties of *Bacillus* species isolated from mangroves of Vellar estuary, Southeast coast of India. *Journal of Parasitic Diseases*. Sep;39(3):385-92. doi: 10.1007/s12639-013-0371-9.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*, 90-99
- Barnawal, D., Maji, D., Bharti, N., & Chanotiya, C. (2013). ACC deaminase-containing *Bacillus subtilis* reduces stress ethylene-induced damage and improves mycorrhizal colonization and rhizobial nodulation in *Trigonella foenum-graecum* under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 809–822. Doi:10.1007/s00344-013-9347-3
- Barnett, H. (1960). *Illustrated genera of Imperfect Fungi* (2° Edición ed.). Minneapolis: Buergess publishing company. Pág 46-47
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA*, 147-153.
- Bent, E. (2006). Induced Systemic Resistance Mediated by Plant Grown Promoting Rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). En S. Tuzun, & E. Bent, *Multigenic and Induced Systemic Resistence in Plants* (págs. 240-243). New York USA: Springer.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*, 60:379-406.
- Botero, M., Castaño, J., Saldarriaga, A., & Castro, A. (2013). *Manual práctico de Bacteriología Vegetal*. Manizales: Universidad de Caldas. Pág 201-207
- Buriticá, P. (1999). *Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia*. Bogotá D.C.: Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Instituto Colombiano Agropecuario y Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Pág 106-107
- Bryde, R., & Willetts, H. (1977). *The brown rot fungi of fruit: their biology and control*. Pergamon Press Oxford Pág 30 - 49

- Campos, T., & Tarmín, J. (1991). *Frutales caducifolios. Historia de los frutales caducifolios en Colombia* (1 ed.). (A. Sarmiento, & E. Naranjo, Edits.) Bogotá D.C.: Produmedios. Pág 7-14
- Cao, Y., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B., & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia horticulturae*, 135:32-39.
- Cárdenas, J., & Fischer, G. (2013). *Los frutales caducifolios de Colombia. Capítulo 2 Clasificación Botánica y morfología del manzano, peral, duraznero y ciruelo*. (D. Miranda, G. Fischer, & C. Carranza, Edits.) Bogotá D.C.: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Pág 21-29
- Cassal, C., Teixidó, N., Viñas, I., Llauredó, S., & Usall, J. (2010a). Control of *Monilia* spp. on stone fruit by curing treatments. Part I: the effect of temperature, exposure time and relative and relative humidity on curing efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 19-25.
- Cassal, C., Teixidó, N., Viñas, I., Cambray, J., & Usall, J. (2010b). Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments. Part II: The effect of host and *Monilinia* spp. variables on curing efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 56: 26-30. DOI: 10.1016 / j.postharvbio.2009.11.009
- Cassal, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N., & Usall, j. (2010c). Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 51-63.
- Castañó, J. (2002). *Principios Básicos de fitoepidemiología*. Manizales (Colombia): Universidad de Caldas Pág 135-138.
- Castañó, J. (2015). *Principios Básicos de hongos fitopatógenos* (Vol. 1). (L. Gallego Sepúlveda, Ed.) Manizales, Colombia: Universidad de Caldas. Pág 159
- Castro, A., & Puentes, G. (2012). *Manual para el cultivo de frutales en el trópico. Capítulo 4.3 Ciruelo y duraznero*. (F. Gerard, Ed.) Bogotá D.C: Produmedios. Pág 370-391
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J.J., Argel, L.E., Uribe-Vélez, D., Romero Tabarez, M., Orduz-Peralta, S., Villegas, V., (2012). Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology*. 64, 641–653. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0052-8>.

- Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de Hongos*. (M. C. Cepero de García, S. Restrepo Restrepo, M. Cárdenas Toquica, & M. Vargas Estpiñán, Edits.) Bogotá D. C., Colombia: Universidad de los Andes. Departamento de Ciencias Biológicas. Pág 199-200
- Cesa, L. C., Baez, A., Quintero, V., De la Cruz, J., Castañeda, M., & Muñoz, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Colombian Biological Acta*, 25(1):140-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>
- Chen, F., Everhart, S., Bryson, P., Luo, C., Song, X., Liu, X., & Schnabel, G. (2015). Fungicide-induced transposon movement in *Monilinia fructicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 38-44. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.10.006>
- Chojnacka, K. (2015). Innovative bio-products for agriculture. *Open Chemistry*, 13(1) 932-937.
- Chowdappa, P., Mohan K, S., Jyothi L, M., & Upreti, K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, 65:109–117.
- Dong, Y H, Ling X J, Zhen L X, & Zhang L H. (2000). AIIA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. US A.*, 97 (7): 3526–3531. doi:10.1073 / pnas.060023897.
- Dowling, M, Bryson M, Boatwright H, Wilson J, Fan Z, Everhart S, Schnabe G. (2016). Effect of Fungicide Applications on *Monilinia fructicola* Population Diversity and Transposon Movement. *APS Publications. Phytopathology*, Vol. 106, No. 12, 106; 1504 - 1512. Obtenido de <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0127-R>
- Dursun A, Ekinici M, & Donmez M. (2010). Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 42, 3349–3356.
- EPPO, G. (12 de septiembre de 2009). *Diagnostic protocols for regulated pests. Monilia fructicola*. Obtenido de PM7 / 018 (2) *Monilinia fructicola*: <https://gd.eppo.int/standards/pm7/>
- FAOSTAT. (12 de septiembre de 2019). *FAO statistic database on the world wide base*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

- FRAC, c. 1. (22 de septiembre de 2019). *Fungal control agents soted by cross resistenace pattern and mode of action*. Obtenido de <https://www.frac.info/home>
- García, L., Zeriuoh, H., & Romero, D. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate-and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbiology Biotechnology*, 6:264–274.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Franscesco, A., Usuall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219-225.
- Grimmer, M., Van den Bosch, F., Powers, S., & Paveley, N. (2015). Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Management Science.*, 71 (2): 207-15. Obtenido de <https://doi.org/10.1002/ps.3781>
- Guarín, Y., Patiño, M., & Martínez, W. (2019). Identificación del agente causal de la pudrición parda en frutos de duraznero (*Prunus pérsica*, L. Batsch) en Boyacá. *Entramado vol.15*, 298-309. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.5418>
- Hrustic, J., Delibasic, G., Stankovic, I., Grahovac, M., Kristic, B., Bulajic, A., & Tanovic, B. (2015). *Monilinia* spp. causing brown rot of stone fruit in Serbia. *Plant disease*, 99:709-717.
- Index fungorum. (17 de octubre de 2019). Obtenido de *Monilia*. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Monilia>
- Jayaraj, J., Yi, H., Liang, G., Muthukrishnan, S., & Velazhahan, R. (2004). Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111:115–125.
- Kang, S., Radhakrishnan, R., You, Y., Joo, G., & et al. (2014). Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard Plant Growth. *Indian Journal of Microbiology*, (54) 427–433.
- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., & Hain, R. (2000). FZB24 *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*.1, 72–93.
- Kumar, N. (2012). Lantibiotics a novel antimicrobial agents: a review. *Pharmacol Sci Monit*, 3(4):2990–3009.

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Pág 102-107
- Li, S., Hua, G., Liu, H., & Guo, J. (2008). Analysis of defence enzymes induced by antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* strain AR12 towards *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Annals of Microbiology*, 58:573–578.
- Li, S., Zhang, N., Zhang, Z., Luo, J., Shen, B., Zhang, R., & Shen, Q. (2013). Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. *Biology and Fertility of Soils*, 49:295-303.
- Li, Q., Wu, L., Hao, J., Luo, L., Cao, Y., & Li, J. (2015). Biofumigation on Post-Harvest Diseases of Fruits Using a New Volatile-Producing Fungus of *Ceratocystis fimbriata*. *PLOS ONE*, 10(7), e0132009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132009>
- Lillian, F. (2006). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Montevideo, Uruguay Pág 16, 204.
- Lippincott, W., & Wilkins, I. (2006). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3° Edición ed.). Montevideo: Panamericana. Pág 19-24
- Liu, W., Jacquiod, S., Brejnrod, A., & et al. (2019). Deciphering links between bacterial interactions and spatial organization in multispecies biofilms. *The ISME journal*, 13, 3054–3066
- Llácer, G., López, M., Trapero, A., & Bello, A. (2000). Patología vegetal (Vol. 2. Edición). Madrid, España: Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma. Pág 885-890.
- Lu, J., Stevens, C., Khan, V., Kabne, M., & Wilson, C. (1991). The effect of ultraviolet irradiation on shelf life and ripening of peaches and apples. *Journal of food Quality*, 14, 299-305.
- Lui, J., Zhou, T., He, D., Li, X., Wu, H., Lui, W., & et al. (2011). Functions of lipopeptides bacilomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* CO6 towards *Monilinia fructicola*. *Journal molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 43-52.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Bacterias gram positivas* (Vol. 1). Madrid, España: editorial Medica Panamericana. Pág 34-56
- MADR. (14 de agosto de 2019). *Insumos registrados ante el ICA y permitidos para la producción ecológica, mediante la resolución 0187 del 2006 del MADR*. Obtenido de <https://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/Agricola/Copia-de-INSUMOS-PERMITIDOS.pdf.aspx>

- Mandigan M, & Parker J. (2001). *Brock Biología de los microorganismos* (Vol. 5 th). Prentice Hall. Pág 423, 519, 725.
- Mari, M., Gregori, R., & Donati, L. (2004). Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid. *Postharvest Biology and Tecnology*, 33, 319-325.
- Mari, M., Leoni, O., Bernardi, R., Neri, F., & Palmeri, S. (2008). Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Tecnology*, 47, 61-67.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Madrin, J., Lichou, J., & et al. (2007). Control of postharvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico chemical treatments. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 87, 1271-1277.
- Meena, K., & Kaanwar, S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents; applications in food safety and therapeutics. *Biomed Research International*, 2015; 473050.
- Mosquera S, González L, Orduz S, Villegas V. (2014). Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3, 378–385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.004>.
- Muñoz, Z., Moret, A., & Bech, J. (2008). Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Monilinia* spp. y pruebas de patogenicidad sobre manzana. *Agrociencia*, (1) 119-128.
- NCBI, T. N. (22 de octubre de 2019). *Bacteria. Bacillus subtilis*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Olarte, J. (1991). *Frutales caducifolios en Colombia. Especies y variedades*. (A. Sarmiento, & C. Naranjo, Edits.) Bogota D.C.: Produmedios. Pág 17-24
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potencial of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 29-38.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus*: lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*, 16(3); 115-125.
- Patiño H, Bustamante R, & Vásquez D. (2012). Manejo biológico en la filósfera: modelo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano (Musa AAA). En L. Hoyos Carvajal, *Enfermedades de plantas: control biológico*. Bogotá D. C.: Ecoe Ediciones. Pág 179-187

- Petróczy, M. (2007). *First report of brown rot caused by Monilinia fruticola on Imported peach in Hungary*. (A. Robertson, Ed.) Hungría: Departament of Plant Pathology. doi:<https://doi.org/10.1094/PD-90-0375B>
- Petróczy, M., & Palkovics, L. (2009). First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European journal of plant pathology*, 125(2), 343-347.
- Pieterse, C., Zamioudis, C., Berendsen, R., Weller, D., Van Wees, S., & Bakker, P. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-375.
- Pinzón, E., Morillo, A., & Fischer, G. (2014). Aspectos fisiológicos del duraznero (*Prunus persica* [L] Batch), en el trópico alto. Una revisión. *UDCA Act. Div. Cient*, 17 (2):401-411. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262014000200011&script=sci_abstract&tlng=pt
- Posada, L., Villegas E., V., & Romero T., M. (2017). *Bacillus subtilis*: microorganismo promotor de crecimiento vegetal. En *Promoción de crecimiento vegetal de Bacillus subtilis EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico* (pág. 204). Bogotá D. C.: Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
- Pourbabae, A., Bahmani, E., Alikhani, H., & Emami, S. (2016). Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing ACC deaminase. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 18, 855–864.
- Raaijmakers, J., & Mazzola, M. (2012). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology*, 50: 403-424.
- Radhakrishnan, R., & Lee, I. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 181–189.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. (2017). *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Frontiers in Physiology* 8:667.
- Ramírez, C., & Kloepper, J. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8):835-844. doi: DOI: 10.1007/s00374-010-0488-2
- Realpe, M., Hernández, C., & Agudelo, C. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Imágenes en Biomedicina*, 106-109.

- Rivera L D, & Castaño, J. (2011). Etiología de la muerte descendente del duraznero (*Prunus persica* [L] Batsch) en los municipios de Manizales y Villamaria, departamento de Caldas. *REV. Academia Colombiana. Ciencias.*, 35 (134): 61-69. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v35n134/v35n134a06.pdf>.
- Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R. *et al.* (2007). A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, 226: 283–97
- Rudrappa, T., Czymme, K., Paré, P., & Bais, H. (2008). Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, 148:1547-1556.
- Ryu, C.-M., Farag, M., Hu, C.-H., Reddy, M., Kloepper, J., & Pare', P. (2004). Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, Plant Physiology. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389924/pdf/1341017.pdf>
- Ryu, H., Park, H., Sang Suh, D., Ho Jung, G., Park, K., & Dae Lee, B. (2014). Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1. *Journal of Ginseng Research*, 38; 215-219.
- Sailaja, P., Podile, A., & Reddanna, R. (1997). Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF-1 rapidly induces lipoxigenasa in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. *European Journal Plant Pathology*, 104: 125-132.
- Salgado, C. (2011). *Identificación molecular de especies de Monilinia spp. que afectan la producción de durazno, Prunus persica en las provincias de Carch, Imbabura, Pichincha y Tungurahua*. Quito: Universidad Santiago de Quito. Tesis de Licenciatura.
- Schnabe, G., Chen, F., Everhart, S., Bridges, W., & Liu, X. (2014). Studies on Sensitivity Reduction in Solo and Mixture Treatments and Fungicide-Induced Mutagenesis in *Monilinia fructicola*. *Papers in Plant Pathology. University of Nebraska - Lincoln*, 263-268. Obtenido de <https://digitalcommons.unl.edu/plantpathpapers/375/>
- The Plant List. (22 de octubre de 2019). *Prunus*. Obtenido de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rosaceae/Prunus/>
- Toro, M., Azcon, R., & Barea, J. (1997). mprovement of Arbuscular Mycorrhiza Development by Inoculation of Soil with Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria To Improve Rock Phosphate Bioavailability (32P) and Nutrient Cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4408–4412.

- Torres, P. (2012). *Plaga cuarentenaria Monilinia fructicola (Winter) Honey Duraznos (Prunes persicae) y nectarinos (Prunus persica var. nucipersicae)*. Santiago de Chile: Gobierno de Chile. Subdepartamento de Sanidad vegetal. Obtenido de https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/ficha_monilinia_fructicola.pdf
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guirio, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1151-1160.
- Traigiano, R., Windham, M., & Windham, A. (2004). Plant pathology. Concepts and Laboratory exercise. First Editions. Pág 131
- Ulloa, M. (22 de octubre de 2019). *Ciclo de vida de Monilia fructicola (Euscomycetes)*. Obtenido de Reino de los hongos: <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/32018?proyecto=Irekani>
- Villarreal M, Villa E, Chávez C, Estrada M, & Parra F. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1): 95-130.
- Villarreal M, Villa, E., Cira L, Estrada A, Parra, F, & De los Santos V. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Plant Pathology*, 36(1): 95-130. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., & Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 23(4): 744-754.
- Wang H, Shi Y, Wang D, Yao Z, Wang Y, Liu J, Zhang, Wang A. (2018a). A Biocontrol Strain of *Bacillus subtilis* WXCD105 used to control Tomato *Botrytis cinerea* *Cladosporium fulvum* Cooke and Promote the growth of seedling. *International Journal of Molecular Sciences* May; 19(5): 1371. doi: 10.3390/ijms19051371
- Wang, X., Zhao, D., Shen, L., JING, C., & Zhang, C. (2018b). Chapter 9. Application and Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease. En V. Meena, *Role of Rhizospheric Microbes of soil* Sinapore: Springer Nature Pte Ltd. págs. 225-250.
- Wilson, C., & Wisniewski, M. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annual Review Phytopathology*, 27, 425–441.

- Wong, M., Liang, X., Smart, M., Tang, L., Moore, R., Ingal, B., & et al. (2016). Microbial Herd Protection Mediated by Antagonistic Interaction in Polymicrobial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(23):6881-6888.
- Xie, S., Wu, H., Zang, H., Wu, L., Zhu, Q., & Gao, X. (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 655–663.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., & Guo, et al. (2014). Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 30: 835–845.
- Xue, Y., Xu, H., Haotian, C., Rui, Y., & Fang, W. (2019). *Bacillus methylotrophicus* has potential applications against *Monilinia fructicola*. *Open Life Science*, 14: 410–419.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., HuI, L., & Chun, L. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal Chemical Engineering*, 19:128-134.
- Yáñez, V., Zeriuoh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., De Vicente, A., Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (4): 609-619. doi: DOI: 10.1007 / s10658-011-9905-0
- You, C., Zhang, C., Kong, F., Feng, C., & Wang, J. (2016). Comparison of the effect of biocontrol agents *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl- manconzeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. *Ecological engineering*, 91:119-125.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of peper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2):138-145.
- Yuan, X., Hou, X., Chang, H., Yang, R., Wang, F., & Liu, Y. (2019). *Bacillus methylotrophicus* has potential applications against *Monilinia fructicola*. *Open Life Sciences*, 14: 410–419. doi:https://doi.org/10.1515/biol-2019-0046
- Zapata C. J. (2002). Principios básicos de fitoepidemiología. Universidad de Caldas. Centro editorial. Manizales (Colombia). Pág. 500:135- 137, 166-167.
- Zhang, B., Qin, Y., Han, Y., Dong, C., Li, P., & Shang Q. (2016). Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochimica Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics*. 1864:1152-1159.

- Zhou, M., Li, P., & Wu, S. (2019). *Bacillus subtilis* CF-3 Volatile Organic Compounds Inhibit *Monilinia fructicola* Growth in Peach Fruit. *Frontiers in Microbiology*, 10:1804.
- Zhu, X., Chen, X., & Guo, L. (2011). Population structure of brown rot fungi on stone fruits in China. *Plant disease*, 95(10), 1284-1291.